

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Química Física



## TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevos nanomateriales híbridos con aplicaciones  
biofotónicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**M<sup>a</sup> Eugenia Pérez-Ojeda Rodríguez**

Directores

Inmaculada García-Moreno  
José Luis Chiara Romero

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de CC. Químicas

Departamento de Química Física



# **DESARROLLO DE NUEVOS NANOMATERIALES HÍBRIDOS CON APLICACIONES BIOFOTÓNICAS.**

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por

**M<sup>a</sup> Eugenia Pérez-Ojeda Rodríguez**

Para optar al grado de Doctor

Directores: Prof. Inmaculada García-Moreno y Dr. Jose Luis Chiara Romero.

Instituto de Química Física “Rocasolano”  
Instituto de Química Orgánica General.

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



MADRID 2014



<b>Abreviaturas y acrónimos.....</b>	<b>7</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>9</b>
<b>Summary.....</b>	<b>13</b>
<b>Introducción general y estructura de la memoria.....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>21</b>
<b>BLOQUE I</b>	
<b>1. Síntesis y Estudio de nuevos colorantes BODIPYs con emisión modulable.....</b>	<b>25</b>
1.1 Introducción.....	25
1.2 Resultados y discusión.....	27
1.2.1. Nuevos BODIPYs con emisión en la zona roja del espectro.....	27
1.2.2. Nuevos BODIPYs con emisión en la zona azul del espectro.....	39
1.3 Conclusiones.....	45
Referencias.....	46
Anexo (Artículos 1-6).....	49
<b>2. Nuevos colorantes híbridos BODIPY-POSS con estabilidad incrementada.....</b>	<b>113</b>
2.1 Introducción.....	113
2.2 Resultados y discusión.....	115
2.3 Conclusiones.....	119
Referencias.....	120
Anexo (Artículo 7).....	123
<b>BLOQUE II</b>	
<b>3. Síntesis controlada de derivados hetero-Bifuncionales de POSS.....</b>	<b>141</b>
3.1 Introducción.....	141
3.2 Resultados y discusión.....	145
3.3 Conclusiones.....	154
3.4 Parte Experimental	155
3.4.1 Consideraciones generales.....	155



3.4.2	Síntesis de alquinos.....	159
3.4.3	Síntesis de derivados de POSS heterobifuncionales.....	159
	Referencias.....	170
<b>4.</b>	<b>Síntesis y Estudio de Dendrímeros multivalentes <math>\alpha</math>-D-manosilados de POSS...</b>	<b>71</b>
4.1	Introducción.....	177
4.2	Resultados y discusión.....	188
4.2.1.	Síntesis y estudio de Glicodendrímeros con simetría cúbica.....	188
	A Síntesis y caracterización de dendrímeros de $\alpha$ -D-manosa con núcleo de POSS T8.....	188
	B Estudio de interacción de dendrímeros $\alpha$ -D-manosilados con núcleo de POSS frente a la lectina concanavalina A.....	201
	B.1. Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR).....	203
	B.2. Calorimetría de Valoración Isotérmica (ITC).....	212
4.2.2	Síntesis y estudio de glico-POSS fluorescentes.....	215
	A Síntesis y caracterización de glico-POSS marcados con sonda fluorescente.....	215
	B Estudio de interacción con lectinas de los dendrímeros $\alpha$ -D-manosilados de POSS marcados fluorescentemente.....	219
	B.1 Polarización o Anisotropía de Fluorescencia.....	220
	- Experimentos de interacción a pH 7.4.....	222
	- Efecto del pH sobre el equilibrio de complejación .....	225
	- Ensayo de interacción en función de la concentración de ligando a pH 7.4 .....	227
	- Ensayo de interacción a concentración fija de Con A y concentración creciente de ligando.....	228
	- Ensayos de competición.....	230
	B.2 Aplicación de los glico-POSS fluorescentes como sondas específicas de lectinas (DC-SIGN) en microscopía confocal celular.....	234

4.3	Conclusiones.....	237
4.4	Parte Experimental.....	238
4.4.1.	Materiales y métodos.....	238
A	Caracterización de Glicodendrimeros.....	238
B	Estudios de interacción de los Glicodendrimeros.....	239
4.2.2	Síntesis de Glicodendrimeros.....	241
A	Metodología general para las reacciones “click” de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizadas por cobre (I) (CuAAC).....	241
B	Metodología general para la desprotección de los grupos isopropiliden acetales.....	242
C	Síntesis de Glicodendrimeros de $\alpha$ -D-manosa simétricos.....	242
D	Síntesis de Glicodendrimeros de $\alpha$ -D-manosa marcados con sonda fluorescente BODIPY.....	253
D.1.	Derivados con 7 unidades de $\alpha$ -D-manosa con distinto espaciador.....	253
D.2.	Derivados con 21 unidades de $\alpha$ -D-manosa con distinta longitud de espaciador.....	258
	Referencias.....	264
<b>5.</b>	<b>Síntesis y Estudio de glico-POSS multivalentes de <math>\beta</math>-D-galactosa y lactosa.....</b>	<b>73</b>
5.1.	Introducción.....	273
5.2	Resultados y discusión.....	275
5.2.1	Síntesis de compuestos multivalentes de $\beta$ -D-galactosa y lactosa.....	275
5.2.2	Estudios de interacción entre los glico-POSS de $\beta$ -D-galactosa o lactosa y galectinas.....	281
A	Estudios de interacción del glico-POSS de $\beta$ -D-galactosa.....	282
B	Estudios de interacción del glico-POSS de lactosa.....	284
5.3	Conclusiones.....	289
5.4	Parte Experimental.....	289
5.4.1	Materiales y métodos.....	289
5.4.2	Síntesis de los alquínil-derivados de $\beta$ -D-galactosa para las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino.....	290

5.4.3	Síntesis de los glico-POSS de $\beta$ -D-galactosa marcados con sonda fluorescente .....	292
5.4.4	Síntesis de los alquil-derivados de lactosa para las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino.....	295
5.4.5	Síntesis de los glico-POSS de lactosa marcados con sonda fluorescente...	298
5.4.6	Síntesis del modelo monovalente de lactosa para los estudios de interacción con galectinas.....	300
	Referencias.....	302
<b>6.</b>	<b>Agregación supramolecular de dendrímeros de POSS en medio acuoso.....</b>	<b>307</b>
6.1	Introducción.....	307
6.2	Resultados y discusión.....	311
6.2.1	Anisotropía de Fluorescencia.....	311
6.2.2	Dispersión dinámica de luz.....	315
	A Confirmación del proceso de agregación observado previamente por AF.....	317
	B Estudio de la influencia del BDP en el proceso de agregación.....	320
	C Estudio de la influencia del disolvente en la agregación.....	321
	D Estudio de interacciones carbohidrato-carbohidrato como posibles responsables de la agregación.....	324
	E Influencia del grupo 1,2,3-triazol del conector en la agregación.....	325
6.2.3	Microscopía de fuerza atómica.....	326
6.2.4	Microscopía electrónica de barrido en modo transmisión.....	329
6.2.5	Resonancia Magnética Nuclear.....	332
6.2.6	Cromatografía de permeación en gel.....	333
6.2.7	Ultracentrifugación Analítica.....	335
6.2.8	Estudio fotofísico de la agregación.....	342
6.3	Conclusiones.....	351
6.4	Materiales y métodos.....	353

Referencias.....	356
<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>363</b>
<b>Anexos (CD).....</b>	<b>367</b>

**Abreviaturas y acrónimos**

Ac	Acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
AF	Anisotropía de fluorescencia
AFM	Microscopía de fuerza atómica
atm	Atmósferas de presión
AUC	Ultracentrifugación analítica
BOC	<i>tert</i> butoxicarbonilo
BODIPY o BDP	Boradiazadipirrometeno
CDR	Centro de reconocimiento de carbohidratos
CLR	Receptor de lectinas tipo C
cmc	Concentración micelar crítica
Con A	Concanavalina A
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMAP	<i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
DLS	Dispersión dinámica de luz
Ec	Ecuación
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Ef	Eficiencia
eq. ó equiv	equivalente
ES	Electrospray
FP	Polarización de fluorescencia
FRET	Transferencia de energía Förster
FT	Transformada de Fourier
Gal	Galectina
GPC	Cromatografía de permeación en gel
h	Hora
HEMA	2-hidroxietilmetacrilato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation experiment
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation experiment

ICT	Transferencia de carga intramolecular
IPD	Índice de polidispersidad
ITC	Calorimetría de Valoración Isotérmica
IR	Infrarrojo
Lac	Lactosa
MALDI-TOF	Ionización/desorción con láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo
Man	Manosa
min	Minuto
MS	Espectrometría de Masas
MMA	Metacrilato de metilo
MW	Microondas
Nd-YAG	<i>Neodymium-doped yttrium aluminium garnet</i> Nd:Y <sub>3</sub> Al <sub>5</sub> O <sub>12</sub>
PBS	Tampón fosfato salino
PM	Pirrometeno
PMMA	Polimetacrilato de metilo
Prop	Propil
Rdto.	Rendimiento
Rh	Rodamina
RMN	Resonancia magnética nuclear
SPR	Resonancia de Plasmón de Superficie
S-TEM	Microscopía electrónica de transmisión en modo barrido.
SV	Velocidad de sedimentación
t.a.	Temperatura ambiente
TBET	Transferencia de energía a través del enlace
TEG	Tetraetilenglicol
TES	Trietilsilano
TFA	Ácido trifluoroacético
TFMA	Metacrilato de 2,2,2-trifluoroetilo
THF	Tetrahidrofurano
UV/Vis	Ultravioleta/visible

## **Resumen**

El trabajo de investigación desarrollado durante la presente tesis doctoral se ha dirigido hacia la síntesis y estudio de nuevos nanomateriales híbridos orgánico-inorgánicos sensibilizados en todo el espectro visible por incorporación de colorantes específicos para aplicaciones optoelectrónicas y biofotónicas. El diseño, síntesis y estudio detallado de estos nuevos nanomateriales híbridos, nos ha permitido ampliar los conocimientos sobre los procesos que regulan sus propiedades en relación con su estructura para la obtención de nuevos materiales funcionalizados con aplicaciones específicas.

La memoria se ha dividido en dos grandes bloques; el primero de ellos aborda la síntesis y caracterización óptica de nuevos materiales para la energía y aplicaciones optoelectrónicas, mientras que el segundo aborda el desarrollo de nanomateriales para la salud, concretamente, a la síntesis controlada, caracterización y estudios biofísicos de nanomateriales híbridos funcionalizados con carbohidratos.

La primera parte de esta memoria está dedicada al desarrollo de nuevos colorantes orgánicos e híbridos con emisión láser modulada para aplicaciones optoelectrónicas (Capítulos 1 y 2). Para ello se han sintetizado nuevos colorantes de la familia de los BODIPYs (boradiazadipirrometenos) que, en función de la posición, número y naturaleza del sustituyente introducido en su estructura, nos ha permitido obtener compuestos con emisión de fluorescencia en todo el espectro visible, desde 450 hasta 740 nm. A lo largo de la memoria se desglosan las estrategias abordadas y los logros más relevantes obtenidos con cada una de ellas para desplazar la longitud de onda de emisión hacia el rojo y hacia el azul. Se han obtenido nuevos colorantes BODIPYs con emisión fluorescente y láser altamente eficiente y estable tanto en disolución como en estado sólido. Bajo idénticas condiciones de bombeo, los nuevos colorantes presentaron eficiencias y estabilidades láser muy superiores a las de los derivados comerciales disponibles con emisión en las mismas regiones del espectro. Por otro lado, para incrementar la estabilidad de estos sistemas y evitar la degradación térmica que limita su aplicación, se han sintetizado nuevos materiales híbridos por unión covalente del colorante a un oligosilsexquioxano poliédrico (POSS  $T_8$ ), que presenta un núcleo inorgánico de estructura cúbica y fórmula molecular  $(SiO_{1.5})_8$ . El carácter híbrido del POSS y la unión covalente del colorante al mismo proporciona un canal de disipación de energía térmica sin afectar a las propiedades ópticas del colorante. Se estudiaron las propiedades fotofísicas y láser de estos nuevos materiales híbridos que presentan un incremento significativo de su fotoestabilidad sin reducir, e incluso llegando también a incrementar su eficiencia de emisión.

La segunda parte de esta memoria está dedicada al desarrollo de nuevos materiales híbridos basados en POSS para su empleo como nanobloques de construcción y autoensamblaje (Capítulos 3 y 6) y para la presentación multivalente de biomoléculas (carbohidratos, en esta tesis), implicada en numerosos procesos biológicos (materiales para la salud) (Capítulos 4 y 5). Se ha llevado a cabo un estudio detallado del control del grado de funcionalización del núcleo de POSS, empleando para ello el octakis(3-azidopropil)octasilsesquioxano (octa-azido-POSS) y la reacción de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizada por Cu(I) (un ejemplo paradigmático de reacción “click”). Este estudio nos ha permitido la síntesis controlada de POSS heterobifuncionales con grupos de reactividad ortogonal que posibilitan su empleo como nanobloques de construcción para la síntesis controlada a escala nanométrica de nuevos nanomateriales mediante una aproximación “bottom-up”. Además se sintetizó un POSS etiquetado fluorescentemente con una unidad de colorante y con 7 posiciones reactivas adicionales que permiten la introducción de diversos epítomos para aplicaciones biológicas. Esta metodología se ha empleado para la síntesis de nuevos dendrímeros glicoconjugados que contienen el núcleo de POSS como centro del clúster. Los nuevos glico-POSS se han etiquetado primero en uno de los vértices del cubo de silsesquioxano con un colorante BODIPY, que sirve como sonda fluorescente, y se han funcionalizado después en las siete posiciones restantes con diferentes carbohidratos (manosa, galactosa y lactosa), variando el número de unidades sacarídicas (de 7 a 21) y la longitud del espaciador que conecta la unidad de carbohidrato al POSS. Estos compuestos se han ensayado como sistemas multivalentes frente a proteínas de tipo lectina, que reconocen carbohidratos de forma específica y que tienen gran relevancia en numerosos procesos biológicos implicados en el reconocimiento celular. Se han llevado a cabo diferentes estudios biofísicos de interacción carbohidrato-lectina de nuestros glico-POSS. Los compuestos funcionalizados con D-manosa, se estudiaron frente a la lectina modelo de origen vegetal concanavalina A empleando anisotropía de fluorescencia (AF), gracias a la sonda fluorescente incluida en su estructura, resonancia de plasmón de superficie (SPR) y microcalorimetría (ITC). Se llevó a cabo además un estudio con células dendríticas humanas del sistema inmune que sobre-expresan la lectina DC-SIGN, que reconoce específicamente derivados de D-manosa y que está implicada en el reconocimiento de microorganismos patógenos, empleando microscopía confocal de fluorescencia. Los compuestos funcionalizados con D-galactosa y lactosa se estudiaron frente a galectinas mediante AF. Las galectinas son un grupo de lectinas de interés creciente dado que se ha descrito que están involucradas en muchos tipos de cáncer.



En último lugar, se ha llevado a cabo un estudio de la agregación de nuestros glico-POSS en medio acuoso empleando una combinación de técnicas biofísicas, incluyendo FP, TEM, GPC, RMN, AFM, DLS y ultra centrifugación analítica. De este estudio, se ha concluido que el proceso de agregación está dirigido por la hidrofobia de la estructura de octasilsesquioxano y que se puede modular el grado de agregación controlando la composición global del híbrido orgánico-inorgánico. Se ha observado, además, que la agregación no afecta a su actividad biológica. La agregación en agua de estos sistemas puede ser de gran utilidad para el encapsulamiento de distintas moléculas hidrófobas así como para la liberación controlada de fármacos.

## **Summary**

The purpose of the research work described in this Thesis has been the synthesis and study of new hybrid organic-inorganic nanomaterials that have been sensitized through the entire visible spectrum through the incorporation of specific dyes for optoelectronic and biophotonic applications. The design, synthesis and detailed study of these new hybrid nanomaterials has allowed us to achieve a better and deeper understanding of the complex processes that regulate their properties in relation to their structure, which is key to the preparation of new functional materials.

The Thesis manuscript is divided into two main parts. The first one addresses the synthesis and optical characterization of new materials for photonic applications, while the second deals with the controlled synthesis, characterization and biophysical study of hybrid nanomaterials functionalized with carbohydrate epitopes.

The first part of the manuscript (Chapters 1 and 2) deals with the development of new dyes with modulated emission for optoelectronic applications. We have addressed this work first from the point of view of the dye with the synthesis of new members of the well-known BODIPY family (boradiazadipyrrromethenes) that, through structural modifications, has allowed us to obtain compounds with fluorescence and laser emissions distributed throughout the entire visible spectrum. The manuscript describes all the strategies that we have followed to shift the emission wavelength to the red or to the blue regions of the electromagnetic spectrum as well as the most important outcomes of each strategy. We have obtained new BODIPY dyes showing a highly efficient and stable fluorescence and laser emissions both in solution and in the solid state. Under identical pumping conditions, the new laser dyes showed much higher efficiencies and stabilities than commercially available products emitting in the same spectral regions. Depending on the nature and position of the substituents of the BODIPY chromophore, we were able to modulate the emission wavelength along the entire visible spectrum, between 450-740 nm. Furthermore, to increase the stability of these systems and to avoid the thermal degradation of the dyes, which limits their applications, we have synthesized new hybrid materials by covalently attaching the dye to a polyhedral oligosilsesquioxane (POSS  $T_8$ ), with an inorganic core of cubic structure and molecular formula  $(SiO_{1.5})_8$ , which provides a channel for heat dissipation without affecting the optical properties of the dye. We have studied the laser and photophysical properties of the new hybrid dyes, finding a marked improvement in photostability without compromising their efficiency, which even improved in some cases.

The second part pursues the development of new hybrid materials based on POSS for their use as nanobuilding blocks and self-assembly (Chapters 3 and 6) and for the multivalent display of biomolecules (carbohydrates, in this thesis), involved in numerous biological processes (Chapters 4 and 5). A detailed study of the control of the degree of functionalization of the POSS core has been carried out by employing the octakis(3-azidopropyl)octasilsesquioxane (octa-azido-POSS) and the Cu(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition (a paradigmatic example of "click" reaction). This study has allowed us to control the synthesis of heterobifunctional POSS functionalized with orthogonal reactive groups, which allows their use as nanobuilding blocks and for the controlled synthesis of new nanomaterials by a "bottom-up" approach. Furthermore, following this approach we have synthesized a fluorescently labeled POSS having with 7 additional reactive groups that allow further insertion of appropriate bioepitopes for biological applications. This methodology has been used for the synthesis of new glycoconjugated dendrimers with a POSS core as the center of the cluster. The new glyco-POSS were first labeled at one corner of the silsesquioxane cage with a BODIPY dye, which serves as the fluorescent probe, and then with different carbohydrates (mannose, galactose, and lactose) at the remaining seven positions, varying the number of saccharide units (7 to 21) and the length of the linker connecting the carbohydrate unit to the POSS core. These compounds have been tested as multivalent systems for lectin-type proteins that recognize carbohydrates specifically and that are of paramount importance in many biological processes involved in cell recognition. We have performed various biophysical studies of the carbohydrate-lectin interaction of our glyco-POSS. The D-mannose-functionalized compounds, were studied against the model plant lectin concanavalin A by using surface plasmon resonance (SPR) and microcalorimetry (ITC). Also, by including in their structure the BODIPY probe, its lectin binding activity was also evaluated using fluorescence anisotropy (FA). Additionally, a study with human dendritic cells that overexpress the lectin DC-SIGN, which specifically recognizes D-mannose derivatives and is involved in the immune system recognition of many pathogens, was conducted by using fluorescence confocal microscopy. The glycol-POSS functionalized with D-galactose and lactose, were studied against several human galectins by FA. The galectins are a group of lectins of growing biomedical interest due to their important role in many cancer processes.

Finally, a study of the aggregation behavior of our glyco-POSS in an aqueous medium has been carried out using a combination of biophysical techniques, including FA, TEM, GPC, NMR, AFM, DLS and analytical ultra centrifugation. From this study, it was found that the aggregation process is driven by the hydrophobicity of the octasilsesquioxane core and that the

degree of aggregation can be modulated by controlling the overall composition of the organic-inorganic hybrid. Furthermore, it has been observed that the aggregation does not affect its biological activity. The self-assembly of water-soluble POSS in aqueous conditions may be useful for the encapsulation of hydrophobic molecules and for controlled drug delivery.

## **Introducción**

La presente tesis doctoral pretende dar respuesta a la creciente demanda de nuevos materiales ópticos avanzados, funcionales y eficaces, capaces de satisfacer las necesidades tecnológicas de aplicación inmediata en la industria y la biomedicina.

En este contexto, los materiales nanoestructurados han demostrado ser muy útiles en el sector de la energía ya que permiten dirigir y modificar procesos que involucran no sólo a los electrones, sino también a los fotones de luz. Las recientes mejoras en el control de la síntesis y propiedades a escala nanométrica prometen producir una mejor generación de láseres, fuentes de luz, fibra óptica y detectores.

En el campo de la nanofotónica, la capacidad de las nanopartículas para recoger energía lumínica (como una pequeña antena) y transmitirla a otro material, hace que estos sistemas sean de gran versatilidad para su empleo como sensibilizadores de células fotovoltaicas o en dispositivos fotónicos (láseres) por señalar algunas de sus aplicaciones más importantes. En particular, los colorantes orgánicos (con distintos sustituyentes, formando sistemas multicromofóricos, encapsulados en un tamiz molecular adecuado o en nanopartículas poliméricas, o bien como colorantes híbridos por incorporación covalente a una nanopartícula inorgánica) proporcionan un amplio abanico de posibilidades para desarrollar nuevos sistemas láser con una mayor eficiencia y fotoestabilidad, modulables en todas las longitudes de onda del espectro visible demandadas para las aplicaciones prácticas.

En el campo de la medicina, la nanotecnología permite mejorar los materiales para dirigirlos tanto a la identificación y diagnóstico de precisión como al tratamiento farmacológico mediante la liberación de compuestos activos en respuesta a estímulos como la luz, el calor o el campo electromagnético. Además de la administración localizada de fármacos, permite el desarrollo de dispositivos de alta sensibilidad con un diseño específico a nanoescala, orientados al diagnóstico precoz sobre fluidos corporales o muestras de tejido tumoral y aporta procedimientos novedosos de tratamientos menos invasivos y largos tales como el uso de nanopartículas para inducir un calentamiento local en el tumor y destruir el tejido dañado o la presentación multivalente de epítomos que bloqueen ciertas dianas biológicas con sondas que posibiliten su monitorización.

Aunando ambas perspectivas, se planteó el diseño y síntesis de nuevos nanomateriales con un control preciso de su estructura y de los elementos que los constituyen para su aplicación en fotónica y nanomedicina, donde haciendo uso de sus propiedades ópticas nos permitan detectar, analizar o manipular sistemas biológicos mediante el empleo de la luz. El

presente proyecto abarca desde la investigación básica, con el estudio fundamental de la interacción de la materia con la luz, hasta la investigación aplicada a través de la preparación y caracterización de materiales funcionales. El trabajo presenta un doble vertiente: por un lado, desde el punto de vista fotónico, se ha abordado la síntesis y estudio de nuevos colorantes orgánicos e híbridos, como medios activos láser altamente eficientes y estables y con emisión modulada en todas las longitudes de onda del espectro visible. Por otro lado, desde un punto de vista biológico, se ha abordado el desarrollo de nuevos nanomateriales funcionalizados con carbohidratos para el estudio de interacciones biológicas relevantes en biomedicina. La combinación de ambos enfoques nos lleva al desarrollo de bio-materiales fotonicos, donde la versatilidad para marcar fluorescentemente sistemas de importante actividad biológica ofrece ventajas muy interesantes y los convierte en herramientas poderosas para estudiar las interacciones celulares a nivel molecular así como para futuras aplicaciones biomédicas.

Los objetivos y conclusiones de esta Tesis están claramente relacionados con los retos planteados como prioritarios en programas de investigación nacionales y europeos (nuevos materiales para la energía y la salud, Photonics 21).

### **Estructura de la memoria**

La memoria se ha dividido en dos grandes bloques, el primero de ellos aborda la síntesis y caracterización óptica de nuevos colorantes, mientras que el segundo está dedicado a la síntesis y estudios biofísicos de nanomateriales híbridos funcionalizados con carbohidratos.

El primer bloque se presenta como una compilación de los artículos a los que han dado lugar estos trabajos de investigación, incluyendo un resumen y discusión de resultados de cada uno de los artículos. Para mayor claridad, estos artículos se han agrupado en dos grupos, atendiendo a los objetivos perseguidos; el Capítulo 1 está dedicado a la síntesis y estudio de nuevos colorantes láser altamente eficientes y estables con emisión en todo el espectro visible, desde el azul al rojo. El Capítulo 2 se centra en definir estrategias para incrementar la estabilidad de colorantes láser sin reducir sus propiedades ópticas. En ambos capítulos se incluyen, por este orden, una introducción general en la que se detallan los objetivos del trabajo, un breve resumen de cada uno de los artículos discutiendo i) la estrategia de síntesis, ii) las propiedades fotofísicas, iii) las propiedades láser y iv) conclusiones y, por último, unas conclusiones conjuntas de los artículos discutidos. Inmediatamente después, se adjunta un anexo con los artículos correspondientes.

En cuanto a la nomenclatura empleada, se han identificado los compuestos

sintetizados con letras en lugar de números para evitar confusiones con la numeración empleada en cada artículo.

El segundo bloque (Capítulos 3-6) recoge trabajo que en su mayor parte está pendiente de ser publicado, por ello se presenta según el formato convencional, dividiendo cada uno de los capítulos en i) introducción, ii) resultados y discusión, iii) conclusiones y iv) materiales y métodos /parte experimental. Además se incluye un CD con los anexos de espectros de RMN de los Capítulos 3-5.

Los compuestos se han enumerado por orden correlativo de aparición en la memoria, sin embargo, para facilitar su lectura a los compuestos finales se les ha dado también un nombre (N-Carbohidrato-Espaciador-POSS-BDP) que atiende a su composición indicando el número y tipo de carbohidrato ( $\alpha$ -D-manosa (Man),  $\beta$ -D-galactosa (Gal) y lactosa (Lac)) seguido del tipo de espaciador ((propargilo (Prop) o tetraetilenglicol (TEG)), el núcleo de silsesquioxano y por último si están o no provistos de sonda fluorescente. En los casos en los que los grupos hidroxilos de los carbohidratos se encuentran protegidos se ha antepuesto el prefijo *p*-.

## **Objetivos**

Los objetivos de esta tesis se encuentran enmarcados en la creciente demanda de nuevos materiales avanzados con múltiples funciones y la necesidad de tecnologías útiles y eficaces con aplicación inmediata en el campo de la energía y biomedicina. De esta forma, se ha dividido la memoria de la tesis en dos grandes bloques: uno de ellos dedicado a la síntesis, modulación y mejora de materiales con aplicaciones ópticas y otro que persigue la síntesis y estudio de nanomateriales híbridos y bioactivos basados en interacciones carbohidrato-proteína. Los objetivos pormenorizados son los siguientes:

### **Bloque I:**

- 1) Síntesis y estudio de nuevos colorantes BODIPY (BDP, boradiaza-s-indaceno) con sustituyentes que permitan modular sus propiedades de emisión fluorescente y láser en todo el espectro UV-vis.
- 2) Modificación de los colorantes BDP para incrementar su foto- y termo-estabilidad mediante la síntesis de colorantes híbridos por anclaje covalente a una nanopartícula de silsesquioxano oligomérico cúbico (POSS T<sub>8</sub>).

### **Bloque II:**

- 3) Síntesis de compuestos heterobifuncionales basados en POSS que permitan el control del grado de sustitución. Introducción de grupos funcionales con reactividad ortogonal para su empleo como nanobloques para la construcción de nanomateriales mediante una estrategia “bottom-up”.
- 4) Aplicación de la metodología para la síntesis de POSS heterobifuncionales con sonda fluorescente.
- 5) Síntesis de sistemas híbridos para la presentación multivalente de carbohidratos basados en POSS (glico-POSS). Preparación de clústeres y dendrímeros de  $\alpha$ -D -manosa y estudio de su interacción con lectinas (Concanavalina A y DC-SIGN) mediante técnicas biofísicas y de bioimagen.
- 6) Síntesis de compuestos multivalentes de  $\alpha$ -D-galactosa y lactosa y estudio de interacción con galectinas mediante técnicas biofísicas.
- 7) Estudio del proceso de agregación de los glico-POSS en medios acuosos en relación a su estructura.



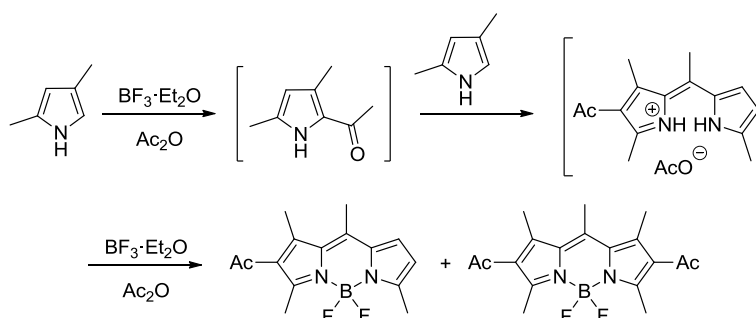
## ***Capítulo 1***

*Síntesis y Estudio de nuevos colorantes BODIPYs  
con emisión modulable.*

## 1.1 Introducción

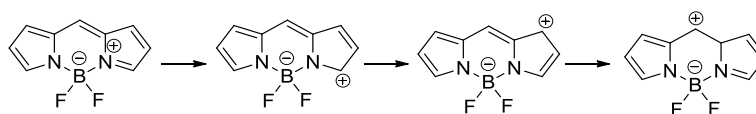
Los colorantes de la familia de los BODIPYs (“difluoroboron *dipyrromethene*”, marca registrada por la empresa *Molecular Probes*)<sup>[1]</sup> son compuestos generalmente apolares con estructura formal de zwitterion, solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, que están basados en el núcleo de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno. Por sus rendimientos cuánticos de fluorescencia habitualmente altos, muchos colorantes de esta familia se han comercializado como etiquetas fluorescentes con sustituyentes específicos para reaccionar con grupos funcionales presentes en moléculas de interés biológico. Todo ello ha generado una intensa actividad investigadora centrada en la síntesis y caracterización de este grupo de colorantes.

Los BODIPYs se describieron por primera vez por Treibs y Kreuzer<sup>[2]</sup> como resultado inesperado de la reacción entre 2,4-dimetilpirrol y trifluoruro de boro eterato en presencia de anhídrido acético, en un intento de  $\alpha$ -acetilar el anillo pirrólico como se muestra en el Esquema 1.1.



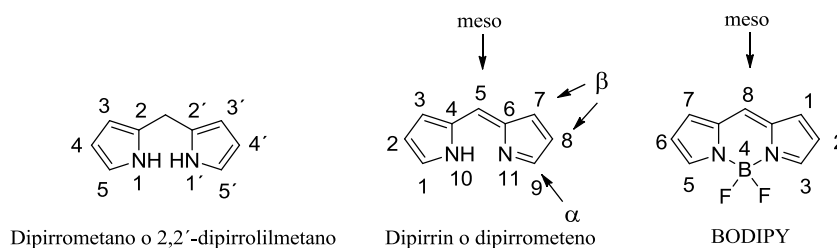
**Esquema 1.1** Ruta de síntesis de los primeros colorantes BODIPYs descritos por Treibs y Kreuzer.

Estos mismos autores propusieron las principales formas resonantes del cromóforo, que justifican su baja polaridad y alta solubilidad en medios orgánicos (Esquema 1.2).



**Esquema 1.2** Formas resonantes del BODIPY.

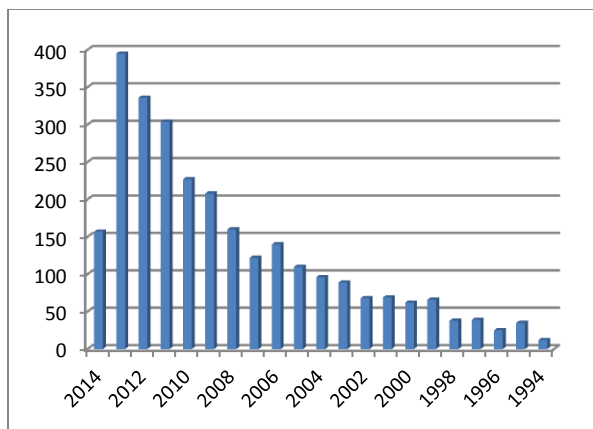
El sistema de numeración IUPAC para el grupo BODIPY es diferente del utilizado para los dipirrometenos,<sup>[3]</sup> aunque los términos  $\alpha$ ,  $\beta$  y *meso* se usan del mismo modo para ambos (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Estructura y numeración del núcleo de dipirrometano, dipirrometeno y BODIPY.

Las rutas de síntesis para la obtención de BODIPYs simétricos son la condensación de  $\alpha$ -H-pirroles con cloruros de ácido, aldehídos o anhídridos; mientras que la síntesis de compuestos asimétricos se lleva a cabo por condensación entre  $\alpha$ -H-pirroles y  $\alpha$ -acilpirroles en presencia de ácidos o bien por modificaciones selectivas de un BODIPY preformado. Estos compuestos presentan una elevada absorción, emiten en la región verde-amarilla (530-595 nm) del espectro electromagnético visible con muy altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, con bandas de emisión estrechas y, algunos de ellos, con una foto-estabilidad aceptable.

Además, son fáciles de modificar químicamente y presentan alta solubilidad y baja tendencia a la agregación por lo que resultan colorantes muy atractivos para una gran variedad de aplicaciones tecnológicas. La Figura 1.2 muestra la evolución del número de publicaciones sobre BODIPYs en revistas científicas a lo largo de los últimos 20 años.<sup>[4]</sup>



**Figura 1.2** Publicaciones sobre BODIPYs en los últimos 20 años.

Existen varias revisiones bibliográficas que describen la síntesis de BODIPYs, sus propiedades espectroscópicas así como las aplicaciones más frecuentes de éstos en la detección de cationes metálicos y aniones, como sensores de pH y de potenciales redox, en terapia

fotodinámica,<sup>[5]</sup> como sondas de imagen, etc.<sup>[6]</sup> Además, sus buenas propiedades químicas y fotofísicas hacen de los BODIPYs unos excelentes candidatos para su aplicación como colorantes láser. En la actualidad, hay un amplio catálogo de colorantes láser disponibles comercialmente basados en estos compuestos (PM546, PM567, PM597... por citar algunos ejemplos).<sup>[7]</sup> Aunque presentan una buena eficiencia láser y una fotoestabilidad aceptable, su emisión está centrada generalmente sólo en la zona verde-amarilla (530-595 nm) del espectro. El objetivo de los trabajos de investigación que se describen en este capítulo es el diseño, síntesis y caracterización de nuevos colorantes BODIPY, con sustituyentes adecuados que permitan modular de forma controlada sus propiedades de emisión fluorescente y láser en todo el espectro UV-vis.

## 1.2 Resultados y discusión

Los resultados de estos trabajos se desglosan en varios apartados, correspondientes a los nuevos BODIPYs con emisión láser en la región roja (Artículos 1 a 4) y en la región azul (Artículos 5 y 6) del espectro.

### 1.2.1 Nuevos BODIPYs con emisión en la **zona roja del espectro**

Existe un interés creciente en el desarrollo de nuevos colorantes fluorescentes que emitan en la zona de baja energía y longitudes de onda elevadas ( $> 600$  nm).<sup>[8]</sup> Estos colorantes muestran varias ventajas sobre los de longitud de onda más corta. Por un lado, presentan mayor penetrabilidad en los tejidos y, por otro lado, no interfieren con el fondo de emisiones autofluorescentes (UV) de las biomoléculas. Sin embargo, aunque hay muchos grupos de investigación trabajando en el desarrollo de estos colorantes y existen varios disponibles en el mercado (BODIPYs -630/650, -650/665 y -TR),<sup>[8b]</sup> hay pocos que presenten buenas propiedades y solubilidad en medios polares, ya que la mayoría tienen bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia, bandas espectrales anchas y, lo que es más limitante, poca fotoestabilidad y baja solubilidad en disolventes polares como alcoholes o agua. Por todo ello, el diseño y síntesis de BODIPYs con emisión optimizada en la región roja del espectro sigue suponiendo un reto actualmente. Las estrategias que se han seguido más comúnmente para desplazar su longitud de onda de emisión hacia el rojo son: 1) introducción de grupos electrodonadores en posiciones 3 y 5; 2) rigidificación del sistema por introducción de anillos fusionados; 3) sustitución del carbono en posición meso por un átomo de nitrógeno tipo imina (aza-BODIPYs); 4) extensión de la

conjugación  $\pi$  del sistema (habitualmente con anillos aromáticos y heterociclos tipo furano y tiofeno); y 5) procesos de transferencia de carga o energía<sup>[9]</sup> (transferencia de carga intramolecular, ICT “intramolecular charge transfer”; transferencia de energía FRET “Förster resonance energy transfer” o a través del enlace TBET<sup>[10]</sup> “through-bond energy transfer”).<sup>[11]</sup> Todas ellas persiguen una disminución de la diferencia de energía entre los orbitales moleculares HOMO y LUMO (GAP) que se traduzca en un incremento de la longitud de onda de emisión.<sup>[12]</sup>

En nuestro grupo de investigación, hemos diseñado, sintetizado y caracterizado la fotofísica y la emisión láser de nuevos BODIPYs con emisión en la zona roja del espectro, tanto en disolución como en estado sólido incorporando los nuevos colorantes en distintas matrices poliméricas. Dado el carácter multidisciplinar del trabajo, estos estudios se han llevado a cabo en colaboración con los grupos de los Profesores M. J. Ortiz (Universidad Complutense de Madrid), Y. Xiao (Dalian University of Technology, China) y K. Burgess (Texas A&M University, College Station, EEUU) como responsables de la síntesis de colorantes, con el grupo del Profesor I. López-Arbeloa (Universidad del País Vasco) como responsable de la caracterización fotofísica. Nuestro grupo de trabajo ha sido responsable de la caracterización láser de los nuevos BODIPYs en fase líquida y del diseño, preparación y caracterización láser de materiales poliméricos dopados con colorantes. A continuación, se resumen las estrategias abordadas para el desplazamiento de la longitud de onda de emisión así como los resultados más importantes obtenidos con cada una de ellas. Se describen sólo aquellos parámetros fotofísicos y láser más relevantes, entendiéndose como tales:

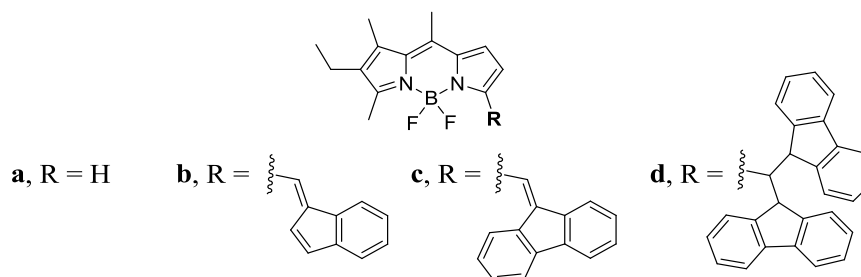
-*Parámetros fotofísicos*: longitud de onda de absorción ( $\lambda_{\text{abs}} \pm 0.5 \text{ nm}$ ), longitud de onda de emisión de fluorescencia ( $\lambda_{\text{flu}} \pm 0.5 \text{ nm}$ ) y rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi \pm 0.05$ ).

-*Parámetros láser*: longitud de onda de emisión láser ( $\lambda_{\text{laser}} \pm 0.1 \text{ nm}$ ), eficiencia de la conversión láser ( $E_f \pm 5\%$ ) definida como el cociente entre la energía de excitación que incide sobre la superficie de la muestra y la de emisión láser inducida en la misma.<sup>[13]</sup> Por último, la estabilidad láser analizada como la pérdida de emisión que experimenta el colorante ( $I(\%)$ ) con respecto a su intensidad inicial  $I_0$ , después de  $[n]$  pulsos de excitación sobre la misma posición de la muestra,  $I(\%) = (I_0/I_n) \times 100$ .

Tanto los parámetros fotofísicos como láser fueron analizados en diferentes disolventes orgánicos para estudiar la influencia de la naturaleza de los mismos sobre las propiedades ópticas de los nuevos colorantes. Por la misma razón, los colorantes fueron introducidos en matrices sólidas de diferente composición polimérica.

**Artículo 1: “Controlling Optical Properties and Function of BODIPY by Using Asymmetric Substitution Effects” *Chem. Eur J.* **2010**, 16, 14094.**

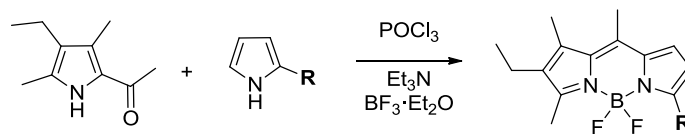
En este artículo se describe la síntesis de BODIPYs sustituidos asimétricamente en la posición 3 con grupos que extienden la conjugación  $\pi$  del sistema (indeno y fluoreno) y el estudio detallado de la relación entre estructura y propiedades de los mismos. La Figura 1.3 muestra las estructuras de los BODIPYs asimétricos estudiados.



**Figura 1.3** Estructura de los nuevos BODIPYs con sustitución asimétrica.

*1.- Síntesis*

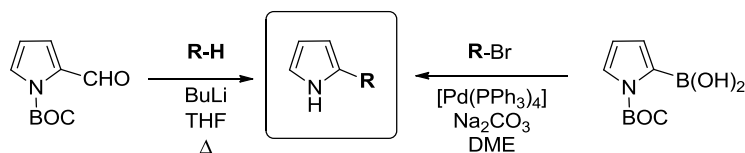
La síntesis de estos derivados se llevó a cabo mediante condensación entre 2-acetil-4-etil-3,5-dimetil-pirrol y los  $\alpha$ -H-pirroles funcionalizados convenientemente en la posición 2 como se muestra en el Esquema 1.3.



**Esquema 1.3** Ruta sintética de los compuestos **a-d**

La etapa clave en todos los casos es la obtención del pirrol precursor debidamente funcionalizado en la posición 2 para lo que se abordaron dos rutas alternativas partir del pirrol N-protegido como *tert*-butilcarbamato (BOC) (Esquema 1.4):

- Mediante reacción con un derivado organolítico del grupo **R** que se pretende introducir.
- Mediante un acoplamiento de Suzuki con un derivado bromado de **R**.

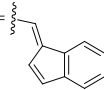
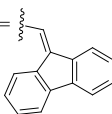
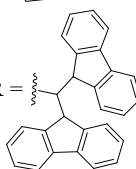


**Esquema 1.4** Rutas de obtención del pirrol precursor funcionalizado en posición 2.

## 2.- Propiedades fotofísicas

Aunque la sustitución con los grupos indeno y fluoreno consigue extender la conjugación, la introducción de sustituyentes voluminosos con giro libre hace que la desactivación del estado excitado ocurra por vías no radiativas dando lugar a bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia (ver Tabla 1.1, compuestos **b** y **c**). Se estudió también el efecto de la sustitución con fluorenos unidos mediante enlace sigma (compuesto **d**) en el que, aunque no se extiende la conjugación, tiene lugar un proceso intramolecular de transferencia de energía a través del espacio mediante un acoplamiento dipolo-dipolo.<sup>[14]</sup> Este proceso induce un desplazamiento batocrómico moderado (13 nm) de la longitud de onda de emisión respecto al compuesto asimétrico de referencia **a**. Además, por la rigidez que impone la congestión estérica de los dos grupos fluorenos perpendicularmente dispuestos, se incrementa su rendimiento de fluorescencia, alcanzándose un valor próximo a la unidad.

**Tabla 1.1** Propiedades fotofísicas y láser de BODIPYs asimétricos con emisión desplazada hacia el rojo.

R =	disolvente	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{flu}}$ (nm)	$\phi$	$\lambda_{\text{laser}}$ (nm)	Ef (%)	I (%) [n]
<b>a</b> , R = H	AcOEt	496	512	0.84	530	34	85 [ $8.0 \times 10^4$ ]
<b>b</b> , R = 	<i>c</i> -hexano	591	596	< 0.02	-	-	-
<b>c</b> , R = 	AcOEt	578	605	0.65	610	6	-
<b>d</b> , R = 	AcOEt	513	525	0.94	540	40	98 [ $7.5 \times 10^4$ ]

## 3.- Propiedades láser

Para analizar las propiedades láser de los nuevos colorantes, estos se irradiaron inicialmente bajo condiciones estándar, es decir, utilizando el segundo armónico del láser de Nd:Yag a 532 nm. Como se seleccionó una geometría de bombeo transversal, la densidad óptica de las disoluciones debe ser alta, en torno a 20, para garantizar que la absorción de la radiación incidente penetre (sea absorbida) en la muestra (0.3 mm). Sin embargo, la baja absorción de

estos colorantes a 532 nm requirió el empleo de concentraciones muy elevadas para alcanzar la densidad óptica requerida provocando problemas de solubilidad y agregación. Por ello, se procedió a la excitación láser de los mismos a longitudes de onda cercanas a su máximo de absorción (508 nm para el compuesto **a** y 585 nm para el resto de compuestos).

Las propiedades láser presentan una buena correlación con las propiedades fotofísicas de tal forma que el compuesto **c**, con un fluoreno  $\pi$  conjugado, emite a 610 nm, pero con baja eficiencia (6%), mientras que el compuesto **d**, con dos unidades de fluoreno unidas por enlace sigma, presenta emisión láser a 590 nm, pero con muy elevada eficiencia (40%) (ver Tabla 1.1). Este compuesto, además, muestra una excelente estabilidad láser ya que mantiene su emisión en más de un 95% con respecto a su emisión inicial tras ser bombeado a una frecuencia de 10 Hz durante  $8 \times 10^4$  pulsos, mientras que otros derivados comerciales que emiten en la misma región, como la cumarina C540A ( $\lambda_{\text{láser}} = 535$  nm y 25% de eficiencia), sólo mantienen un 35 % tras  $3 \times 10^4$  pulsos bajo condiciones idénticas.

El colorante **d** se introdujo en matriz de polimetilmetracrilato (PMMA) para estudiar su comportamiento como láser de estado sólido. Se prepararon también materiales con el compuesto **a**, que hemos utilizado como colorante asimétrico de referencia. Para las matrices dopadas con el compuesto **d**, hemos observado una mejora en la eficiencia (30%) y estabilidad (100% tras  $1 \times 10^5$  pulsos a 10 Hz) así como una longitud de onda de emisión láser de 542 nm desplazada batocrómicamente 11 nm con respecto al colorante **a**.

#### *4.- Conclusiones*

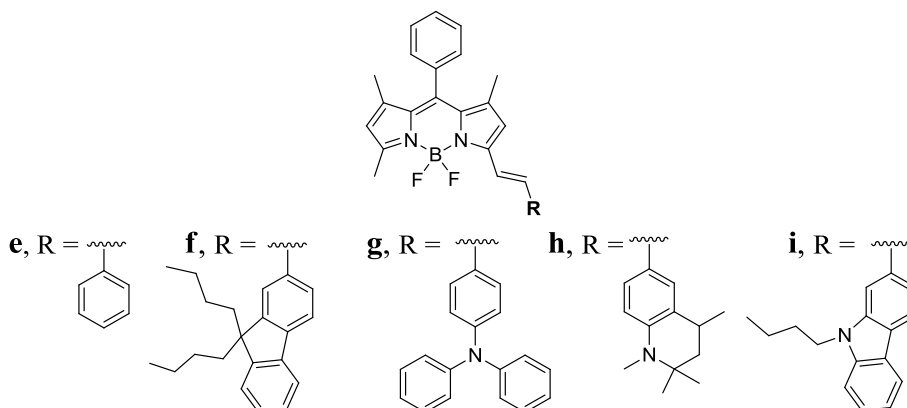
Los nuevos BODIPYs funcionalizados con fluoreno han dado lugar a un colorante láser altamente eficiente y estable cuando ambas entidades están electrónicamente desacopladas. Cuando el fluoreno y el BODIPY están conjugados, se obtiene un colorante con emisión en el rojo (610 nm) que, si bien no es adecuado como colorante láser, es un buen candidato para su aplicación en bioimagen ya que sus regiones de excitación y emisión evitan cualquier posible interferencia de la autofluorescencia de las biomoléculas. Por otro lado, la sustitución con indeno en lugar de fluoreno indujo una disminución drástica de la fluorescencia, pero el colorante resultó ser un buen sensor de cationes  $\text{Fe}^{3+}$ .



**Artículo 2: “Development of excellent long-wavelength BODIPY laser dyes with a strategy that combines extending  $\pi$ -conjugation and tuning ICT effect”** *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 13026.

#### 1.- Síntesis

Se prepararon BODIPYs asimétricos sustituidos en posición 3 con grupos aromáticos que extiendan la conjugación (Tabla 1.2. compuestos **e** y **f**). Además, por introducción de átomos electrodonadores en los sistemas aromáticos, se combinó la estrategia de extensión de la conjugación con posibles procesos de transferencia de carga intramolecular ICT (Tabla 1.2, compuestos **g**, **h** e **i**). La Figura 1.4 recoge las estructuras preparadas.



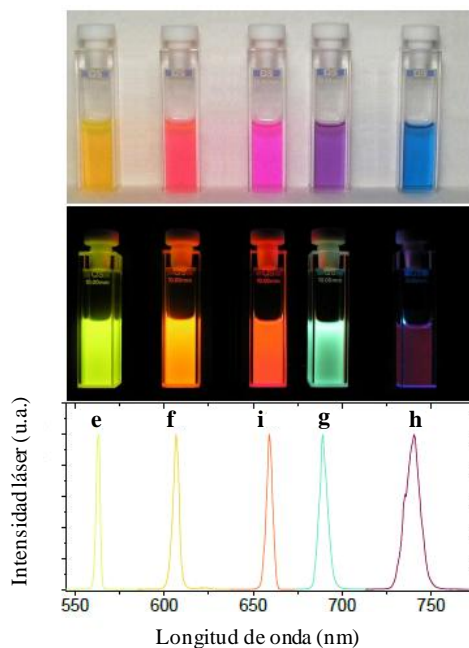
**Figura 1.4** Estructura de los nuevos BODIPYs asimétricos con extensión de la conjugación  $\pi$  y procesos de ICT.

#### 2.- Propiedades fotofísicas

Los compuestos con conjugación  $\pi$  extendida presentaron desplazamientos moderados en su longitud de onda de emisión (Tabla 1.2, compuestos **e** y **f**). En los casos en los que se combina dicha conjugación con procesos de transferencia de carga (Tabla 1.2, compuestos **g-i**), se lograron desplazamientos batocrómicos de la longitud de onda de fluorescencia de hasta 54 nm con respecto al compuesto **e**, alcanzando una  $\lambda_{flu} = 624$  nm para el compuesto **h**. Como era de esperar, las propiedades de los compuestos **e** y **f** prácticamente no mostraron dependencia del disolvente empleado, mientras que para los derivados en los que tienen lugar procesos de ICT (compuestos **g** y **h**) los rendimientos cuánticos disminuyen en medios polares, ya que en esas condiciones se favorece el proceso de ICT en detrimento de la emisión de fluorescencia. Este efecto es menos pronunciado para el compuesto **i** dado que su planaridad favorece la deslocalización del par de electrones del átomo de nitrógeno. Los procesos de transferencia de carga fueron además confirmados mediante estudios de voltaamperometría cíclica.

### 3.- Propiedades láser

El comportamiento láser de los nuevos colorantes BODIPYs se estudió bombeando a 532 nm. Además, para evitar los problemas derivados de las altas concentraciones requeridas que se comentaron con anterioridad, se bombearon también en su máximo de absorción. Al reducir sensiblemente las concentraciones se evitan problemas de agregación y atenuación de fluorescencia y se incrementa la eficiencia láser significativamente (en un factor de hasta 5.3 veces con respecto a los valores registrados bajo bombeo a 532 nm). Los nuevos derivados presentaron buenas eficiencias láser (26-57%, Tabla 1.2), con emisión en el rango de 596-738 nm (ver Figura 1.5).


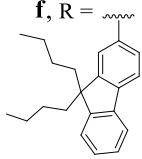
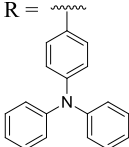
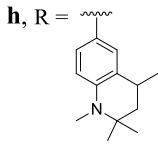
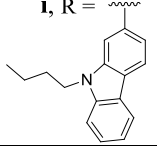


**Figura 1.5** Espectros de emisión láser de los nuevos BODIPYs con emisión modulable hacia el rojo.

Los nuevos colorantes resultaron ser altamente fotoestables ya que los compuestos **e**, **f** e **i** no mostraron signos de degradación alguno al ser bombeados a una frecuencia de repetición de 10 Hz durante  $7.5 \times 10^4$  pulsos (ver Tabla 1.2). Los compuestos **g** y **h** mantuvieron más del 75% de su emisión inicial en idénticas condiciones. Para poner en perspectiva los resultados obtenidos, se comparó el comportamiento láser de los nuevos colorantes con el de otros derivados comerciales que emiten en las mismas regiones del espectro, PM567 ( $\lambda_{\text{láser}} = 560$  nm y 55% de eficiencia), perileno rojo ( $\lambda_{\text{láser}} = 610$  nm y 26% de eficiencia), rodamina 640 ( $\lambda_{\text{láser}} = 640$  nm y 40% de eficiencia) y Nile Blue ( $\lambda_{\text{láser}} = 698$  nm y 23% de eficiencia). Las eficiencias láser de

los nuevos BODIPYs se comparan bien o incrementan las registradas con los colorantes comerciales, pero, lo que es más importante, los nuevos colorantes resultaron ser más fotoestables ya que los colorantes comerciales pierden totalmente su emisión tras  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$  y  $1 \times 10^4$  pulsos, respectivamente. Atendiendo a parámetros de eficiencia y fotoestabilidad, estos nuevos colorantes BODIPYs mejoran las propiedades láser de los actualmente comercializados, bombeados bajo condiciones experimentales idénticas.

**Tabla 1.2** Propiedades fotofísicas y láser de BODIPYs asimétricos con emisión al rojo.

R =	disolvente	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{flu}}$ (nm)	$\phi$	$\lambda_{\text{laser}}^{[a]}$ (nm)	Ef (%)	I (%) [ $7.5 \times 10^4$ ]
<b>e</b> , R = 	EtOH	562	571	0.70	565	46	98
<b>f</b> , R = 	hexano	571	583	0.71	596	57	100
<b>g</b> , R = 	hexano	591	607	0.59	709	28	80
<b>h</b> , R = 	hexano	607	624	0.48	738	26	75
<b>i</b> , R = 	hexano	582	600	0.67	656	39	94

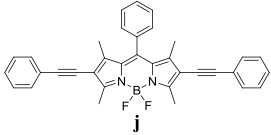
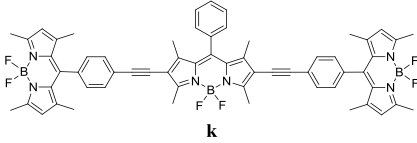
#### 4.- Aplicación en bioimagen

Los nuevos BODIPYs son, además de excelentes colorantes láser, muy versátiles como sondas de bioimagen ya que, al emitir en la región roja del espectro, no interfieren con la emisión asociada a otras moléculas biológicas. Se ensayó el compuesto **i** como colorante de tinción de células cancerígenas mamarias (MCF-7), demostrando una buena permeabilidad celular, ningún signo de citotoxicidad y fluorescencia roja intracelular nítida en las imágenes de microscopía confocal. Todo esto confirma que son candidatos muy competitivos para aplicaciones biológicas.



sugiere que la transferencia de energía de los dos BODIPYs dadores al aceptor **j** ocurre de forma rápida y eficiente ( $k_{ET} \sim 5 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ ). Las propiedades fotofísicas del casete son sensibles a la concentración ya que a altas concentraciones tienen lugar procesos de transferencia de energía TBET (intramolecular) y FRET (intermolecular) simultáneamente.

**Tabla 1.3** Propiedades fotofísicas y láser de casetes multicromofóricos de BODIPYs en AcOEt

Compuesto	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{excitación}}$	$\lambda_{\text{flu}}$ (nm)	$\phi$	$\lambda_{\text{laser}}^{[a]}$ (nm)	Ef (%)	I (%) [ $1 \times 10^5$ ]
	568	575	600	0.57	610	36	
	503	500	600	0.59	609	32	
	569	532	600		624	32	100
		570	600	0.59	610	39	

### 3.- Propiedades láser

El casete **k** presenta una emisión eficiente y estable bajo bombeo a tres longitudes de onda diferentes (500, 532 y 570 nm). Bajo excitación a 532 nm, presenta emisión láser centrada a 624 nm, con eficiencia del 32 % en acetato de etilo y una excelente fotoestabilidad, ya que mantiene el 100% de su emisión inicial, sin mostrar signos de degradación, tras ser bombeado durante  $1 \times 10^5$  pulsos con una frecuencia de repetición de 10 Hz.

Se amplió el estudio del casete **k** como colorante láser de estado sólido. La matriz de PMMA dopada con el colorante **k** mostró buena eficiencia (24%) bajo bombeo a 500 nm manteniendo su elevada fotoestabilidad ya que conservó más del 93% de su emisión inicial tras ser bombeado a 10 Hz durante  $1 \times 10^5$  pulsos.

### 4.- Conclusiones

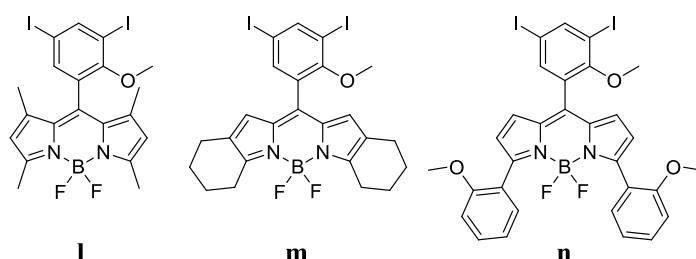
Por primera vez se ha diseñado y sintetizado un casete multicromofórico de BODIPYs que presenta emisión láser altamente eficiente y estable, incluso bajo bombeo en condiciones drásticas, tanto en disolución como en fase sólida. En dicho sistema tiene lugar un proceso altamente eficaz de transferencia de energía TBET que mejora sus propiedades fotofísicas y láser. Además, comparado con otros BODIPYs individuales, el sistema multicromofórico extiende la región de absorción manteniendo altos coeficientes de absorción molar, induce largos desplazamientos de Stokes y elevados rendimientos cuánticos de fluorescencia. Todo ello

sugiere que el nuevo sistema fotónico es un excelente candidato para su posible aplicación en áreas como la optoelectrónica y biofotónica.

**Artículo 4: “Highly efficient and photostable photonic materials from diiodinated BODIPY laser dyes”** *Optical Materials Express*. **2011**, 1, 243.

#### 1.- Síntesis

Se prepararon nuevos colorantes BODIPYs diyodados donde se modulan las propiedades láser por rigidificación de su estructura mediante fusión de anillos (Figura 1.7, compuesto **m**) y extensión de la conjugación  $\pi$  en las posiciones 3 y 5, favoreciendo así la deslocalización electrónica (Figura 1.7, compuesto **n**). Como la síntesis y propiedades fotofísicas de estos colorantes fueron descritas con anterioridad,<sup>[16]</sup> en este trabajo nosotros sólo hemos analizado su comportamiento láser en fase líquida y estado sólido.

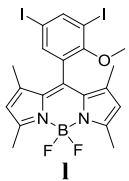
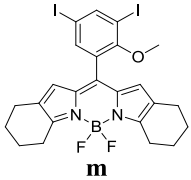
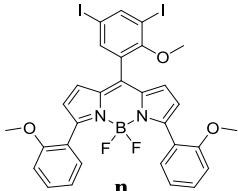


**Figura 1.7** Estructura de los nuevos BODIPYs diyodados.

#### 2.- Propiedades laser

Estos derivados se bombearon a 532 nm exceptuando el compuesto **l** que, debido a su baja absorción a esta longitud de onda, requirió ser bombeado en su máximo de absorción a 515 nm. Dependiendo de la sustitución, se consiguieron modular las de longitudes de onda de emisión láser de 530 a 630 nm, con buenas eficiencias de hasta 50% y elevadas fotoestabilidades, ya que mantienen más del 92% de su emisión inicial tras ser sometidos a un bombeo a 10 Hz durante  $1 \times 10^5$  pulsos (ver Tabla 1.4). Estos resultados mejoran notablemente las estabildades que presentan otros derivados comercialmente disponibles que emiten en la misma región del espectro, como la cumarina C540A ( $\lambda_{\text{láser}} = 535$  nm y 25% de eficiencia), que mantiene sólo el 35% de su emisión tras  $3 \times 10^4$  pulsos, y la rodamina 6G ( $\lambda_{\text{láser}} = 580$  nm y 25% de eficiencia), que pierde completamente su emisión después de  $5 \times 10^4$  pulsos. Además, presentaron muy poca sensibilidad al disolvente empleado (Tabla 1.4).

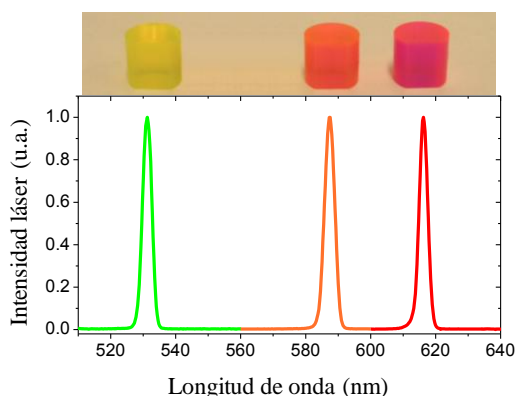
**Tabla 1.4** Propiedades láser de los nuevos BODIPYs diiodados en distintos disolventes.

Compuesto		c-hexano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	MeOH
 <b>l</b>	$\lambda_{\text{laser}}$	536	538	532	534
	Ef (%)	21	34	31	32
	I (%)			92	
 <b>m</b>	$\lambda_{\text{laser}}$	587	594	590	586
	Ef (%)	45	55	52	53
	I (%)			>95	
 <b>n</b>	$\lambda_{\text{laser}}$	586	624	616	619
	Ef (%)	47	50	47	52
	I (%)			>95	

Estos colorantes se estudiaron también como láseres de estado sólido por incorporación de los mismos en matrices poliméricas de PMMA. No se observaron cambios significativos en las longitudes de onda de emisión con respecto a las observadas en disolución. Las eficiencias obtenidas (25-45%) son algo inferiores en fase sólida, como era de esperar por las pérdidas de eficiencia inducidas en la cavidad por los defectos ópticos que se crean en las caras de las piezas sólidas fabricadas, cuyo pulido sí que permitió alcanzar buena calidad óptica, pero no de grado láser. Su comportamiento como láseres de estado sólido se resume en la Tabla 1.5 y la Figura 1.8.

**Tabla 1.5** Propiedades láser en PMMA

Compuesto/PMMA	Ef (%)	$\lambda_{\text{laser}}$	I (%)
<b>l</b>	25	530	90
<b>m</b>	45	585	100
<b>n</b>	32	615	100



**Figura 1.8** Espectros de emisión láser de los sólidos dopados con los colorantes **l** (verde), **m** (naranja) y **n** (rojo).

### 3.- Conclusiones

Los nuevos BODIPYs estudiados presentan muy altas eficiencias (de hasta un 45-55%) y estabilidades excelentes, tanto en disolución como en fase sólida, mejorando notablemente las de otros colorantes disponibles en el mercado. La longitud de onda de emisión se puede modular y desplazar batocrómicamente en función de los sustituyentes empleados.

#### 1.2.2 Nuevos BODIPYs con emisión en la **zona azul del espectro**

Aunque se suele afirmar que la gran accesibilidad sintética de los BODIPYs y que la modificación de sus sustituyentes permiten modular sus propiedades de emisión y acceder a cualquier color que se desee,<sup>[17]</sup> hasta la fecha, existen muy pocos estudios centrados en la síntesis de BODIPYs apropiados para la emisión eficiente y estable en la región espectral azul (400-500 nm).<sup>[18]</sup>

Existen varios colorantes orgánicos con emisión láser en las regiones azul-verde del espectro,<sup>[19]</sup> pero su comportamiento no es tan bueno como el de sus homólogos en la región amarillo a rojo (570-700 nm), ya que presentan baja eficiencia (estilbenos), poca estabilidad fotoquímica, dando lugar a un fotoblanqueo rápido (cumarinas), y baja solubilidad en los disolventes orgánicos más comunes.<sup>[20]</sup> Además, estas moléculas presentan desplazamientos de Stokes demasiado pequeños, por lo que hay un alto solapamiento entre las bandas de absorción y de emisión que dan lugar a fenómenos de emisión-reabsorción que disminuyen su rendimiento cuántico de fluorescencia.<sup>[19a]</sup> Por último, estos colorantes hay que bombearlos en la región UV



del espectro, es decir con fotones muy energéticos, lo que conlleva una mayor fotodegradación de los mismos con respecto a los que se bombean en la región visible del espectro.

En nuestro grupo de investigación, en colaboración con los grupos del Profesor E. Peña-Cabrera (Universidad de Guanajuato, Méjico), como responsable de la síntesis, y del Profesor I. López-Arbeloa (Universidad del País Vasco), encargado de la caracterización fotofísica, hemos estudiado las propiedades láser de nuevos BODIPYs con emisión en la región azul del espectro. El desarrollo de compuestos capaces de emitir fluorescencia y láser de forma eficiente y estable en la zona de alta energía (azul) es de gran relevancia tecnológica por su posible aplicación en optoelectrónica y dispositivos de almacenamiento.

La estrategia seguida se basa en el desarrollo de BODIPYs con derivados alquil- y amino- sustituidos en la posición meso (Artículos 5 y 6, respectivamente) (ver Tabla 1.6).

**Artículo 6: “New 8-aminoBODIPY derivatives: Surpassing Laser Dyes at Blue-Edge Wavelengths” *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 7261.**

#### 1.- Síntesis

Se diseñó la síntesis de nuevos 8-amino-BODIPYs persiguiendo un desplazamiento hipsocrómico de sus bandas espectrales. Aunque *a priori* cabría esperar que los sustituyentes de tipo amino empleados pudieran suponer un desplazamiento batocrómico por su carácter electrodador, la N-sustitución en posición meso supone una desestabilización del orbital molecular LUMO, lo que se traduce en un incremento de la diferencia de energía HOMO/LUMO y por tanto en un desplazamiento hipsocrómico de las bandas de absorción de hasta 100 nm con respecto al BODIPY sin sustituir (compuestos **ñ** y **p**, Tabla 1.6). Se seleccionaron como sustituyentes distintos tipos de aminas (primaria (**o**), secundarias (**p**, **q**, **r**) y terciaria (**s**)) y se realizó un estudio comparativo entre los distintos derivados obtenidos (Figura 1.9).

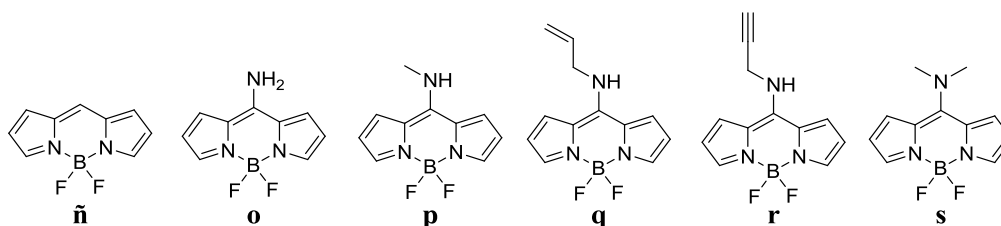


Figura 1.9. Estructuras de los 8-aminoBODIPYs

## 2.- Propiedades fotofísicas






Debido a la variación del momento dipolar que introduce el grupo amino en posición 8, estos derivados son poco solubles en medios apolares y solubles en medios polares como el agua. Este hecho es también responsable del ensanchamiento de bandas que se produce en estos derivados con respecto al compuesto **ñ** no sustituido, ya que el nuevo momento dipolar induce un reordenamiento de la nube  $\pi$ . En medios polares (como metanol), a medida que el carácter electrodonador de la amina aumenta ( $\text{NH}_2 < \text{NHCH}_3$ ), también lo hace el desplazamiento hipsocrómico observado ya que, como se comentó anteriormente, se provoca una mayor desestabilización del orbital LUMO. Sin embargo, en estas condiciones, los rendimientos cuánticos de fluorescencia disminuyen notablemente con respecto a los obtenidos en acetato de etilo (Tabla 1.6), debido a un incremento drástico de los procesos no radiativos, probablemente de transferencia de carga intramolecular ICT. Las otras aminas secundarias con grupos alilo y propargilo (**q** y **r**, respectivamente) siguen esta misma tendencia, pero de forma menos acentuada, ya que dichas insaturaciones reducen el carácter dador de la amina. Las propiedades ópticas de estos derivados correlacionan bien con el carácter electrodonador del sustituyente en meso (parámetro Hammett).<sup>[21]</sup> Así, por ejemplo, las longitudes de onda de fluorescencia siguen el orden  $\lambda_{\text{flu}}$  **p** (444 nm) <  $\lambda_{\text{flu}}$  **q** (459 nm) <  $\lambda_{\text{flu}}$  **r** (469 nm) (ver Tabla 1.6). Los rendimientos cuánticos  $\phi$  también siguen el mismo orden;  $\phi$  **p** (0.42) <  $\phi$  **q** (0.72) <  $\phi$  **r** (0.94), dado que cuanto menor es el carácter electrodonador, menor es también la posibilidad de desactivación por ICT y mayor por tanto el rendimiento. La amina terciaria **s** tiene un carácter electrodonador similar al de la amina **p** y por tanto ambos compuestos presentan longitudes de onda de emisión y absorción similares (Tabla 1.6). Con esta estrategia, se alcanzaron desplazamientos hipsocrómicos de las bandas de fluorescencia con respecto al compuesto no sustituido **ñ**, llegando a alcanzar este desplazamiento hasta 63 nm con respecto al del 8-aminoBODIPY **p**.

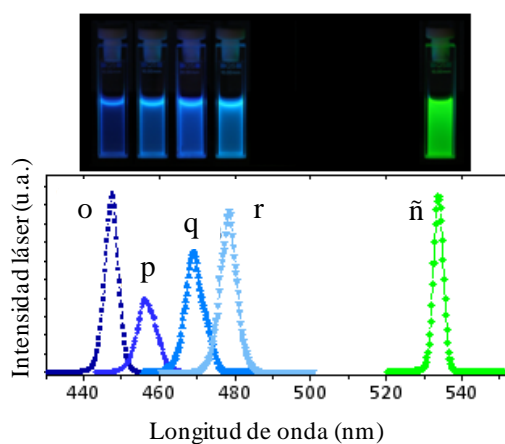
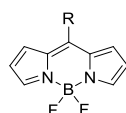
## 3.-Propiedades láser

Los colorantes fueron estudiados bajo bombeo a 355 nm, usando el tercer armónico del laser de Nd:YAG y, para evitar los problemas de concentración explicados con anterioridad, a 400 nm como longitud de onda cercana a su máximo de absorción. En estas condiciones se obtuvieron buenas eficiencias para todos los compuestos (26-62%, ver Tabla 1.6), a excepción de **s** que no presenta emisión láser incluso en las condiciones más drásticas de bombeo. De hecho, este compuesto es el que presenta un menor rendimiento de fluorescencia (0.27 en acetato de etilo y solo 0.09 en metanol). La presencia del grupo amino en posición 8 desplaza la longitud

de onda de emisión láser desde 535 nm del derivado no sustituido **ñ** hasta 450 nm (Tabla 1.6 y Figura 1.10). La inclusión de la amina en posición meso disminuye considerablemente la fotoestabilidad con respecto al derivado **ñ** no sustituido, de nuevo siguiendo la tendencia para las aminas primaria > secundarias > terciaria. Sin embargo, a pesar de esta disminución de la estabilidad, los nuevos colorantes exhiben mejores resultados que los que presentan otros derivados comerciales como las cumarinas bombeadas en las mismas condiciones.<sup>[18a]</sup>

**Tabla 1.6** Propiedades fotofísicas y láser de nuevos BODIPYs meso-sustituídos.

R =	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{flu}}$ (nm)	$\phi$	$\lambda_{\text{laser}}^{[b]}$ (nm)	Ef (%)	I (%) [n]
<b>ñ</b> , R = H	498	507	0.93	534	63	98 [ $1.0 \times 10^5$ ]
<b>o</b> , R = NH <sub>2</sub>	406	444	1.00	451	62	40 [ $1.0 \times 10^5$ ]
<b>p</b> , R = 	398	444	0.42	457	26	20 [ $1.5 \times 10^4$ ]
<b>q</b> , R = 	405	459	0.72	469	44	10 [ $5.0 \times 10^4$ ]
<b>r</b> , R = 	408	469	0.94	479	59	20 [ $5.0 \times 10^4$ ]
<b>s</b> , R = 	399	444	0.27	-	-	-
<b>t</b> , R = 	492	502	0.90	523	28	-



**Figura 1.10** Espectros de emisión láser de los 8-aminoBODIPYs bombeados a 400 nm. La intensidad de las bandas de emisión es proporcional a la eficiencia.

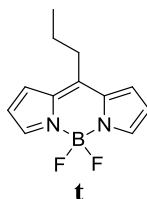
#### 4.- Conclusiones

Los nuevos BODIPYs meso sustituidos con grupos amino permiten modular las propiedades de emisión en función del carácter electrodonador de la amina en un amplio rango de longitudes de onda (440-505 nm) en la zona espectral azul. Estos colorantes son los primeros BODIPYs que presentan emisión láser eficiente (hasta un 62%) y estable en la región azul del espectro, incrementando significativamente el comportamiento de los comercializados actualmente como láseres de colorantes en el azul. Por lo tanto, algunas de las deficiencias más importantes de los colorantes en la región azul han sido superadas por estos nuevos cromóforos diseñados a medida, impulsando así sus posibles aplicaciones tecnológicas.

**Artículos 6: “Unprecedented solid-state laser action from BODIPY dyes under UV-pumping radiation” *Appl. Phys B.* **2012**, 106, 911.**

##### 1.-Síntesis

Las buenas propiedades láser de los derivados BODIPYs sustituidos en meso con grupos amino nos llevó a desarrollar el primer láser de colorante en estado en sólido con emisión eficiente y estable en la región azul del espectro. Cuando se intentaron incorporar los 8-amino-BODIPYs en matrices sólidas mediante polimerización radicalaria térmica, se observó una degradación rápida del colorante por reacciones con los radicales generados en el sistema por la fragmentación del iniciador (AIBN). Para evitar estos problemas, se sintetizó y caracterizó el derivado 8-propil-BODIPY<sup>[22]</sup> **t** sustituido en meso con un grupo alquilo (Figura 1.11), cuyas propiedades fotofísicas se han detallado también en la Tabla 1.6.



**Figura 1.11** Estructura del 8-propil-BODIPY **t**.

##### 2.-Propiedades láser

Este colorante se introdujo en matrices poliméricas de diferente composición, desde el homopolímero PMMA hasta copolímeros de MMA con el monómero fluorado TFMA (metacrilato de 2,2,2-trifluoroetilo). Se seleccionaron estos monómeros por ser los que mimetizan estructuralmente a los disolventes en los que se alcanzaron las mayores eficiencias

láser en disolución bajo bombeo a 355 nm (28% de eficiencia en acetato de etilo y 31% en 2,2,2-trifluoroetanol).

Se doparon las diferentes matrices (PMMA, coMMA-TFMA 9:1 y 7:3) con el BODIPY **t** a la concentración previamente optimizada ( $3 \times 10^{-3}$  M) y se bombearon las matrices a 355 nm. Los resultados de eficiencia láser y estabilidad se recogen en la Tabla 1.7. A pesar de que en disolución se obtiene una mayor eficiencia en 2,2,2-trifluoroetanol, la matriz que optimiza la emisión de este colorante en fase sólida es PMMA, probablemente debido a la menor permeabilidad al oxígeno de esta matriz que disminuiría así los procesos de fotooxidación y degradación con respecto a las matrices fluoradas que son más permeables. En PMMA, se alcanzó una eficiencia del 28% y una buena estabilidad, manteniendo hasta el 50% de su emisión inicial al ser bombeado durante  $4.5 \times 10^4$  pulsos a 10 Hz (ver Tabla 1.7). Este resultado mejora muy notablemente el alcanzado por otros derivados comerciales que emiten en la misma región espectral, como la cumarina C540A incorporada a PMMA, cuya eficiencia es de sólo un 8% y su emisión desaparece por completo tras ser irradiada a durante  $1.5 \times 10^4$  pulsos a 5 Hz, que son condiciones de bombeo menos drásticas que las seleccionadas para bombear el compuesto **t**.

**Tabla 1.7** Propiedades láser del BODIPY **t** en distintas matrices

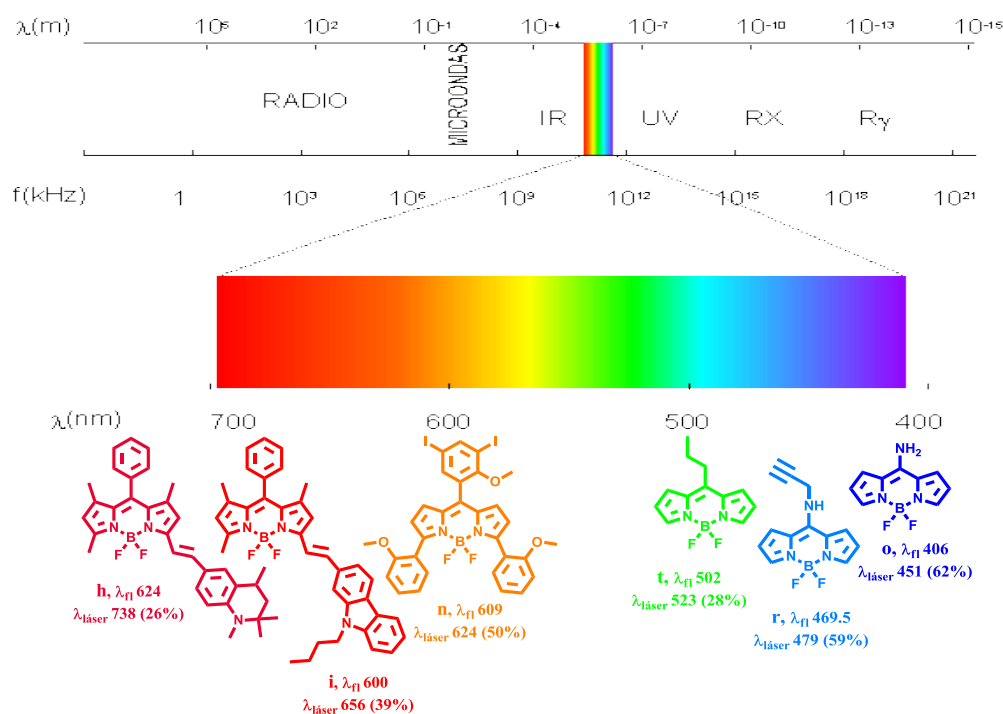
<b>t</b> /PMMA	Ef(%)	$\lambda_{\text{láser}}$	I(%)
PMMA	28	523	50 [ $4.5 \times 10^4$ ]
MMA-TFMA 9:1	29	522	50 [ $2.0 \times 10^4$ ]
MMA-TFMA 7:3	19	522	50 [ $4.5 \times 10^3$ ]

### 3.- Conclusiones.

Se han preparado por primera vez láseres de estado sólido eficientes (hasta 28%) y estables en la región azul-verde del espectro a partir de BODIPYs incorporados en matrices poliméricas bajo condiciones drásticas de bombeo (UV). Esta estrategia puede ser aplicada a nuevos colorantes de esta familia, de forma que se modulen las longitudes de onda en el rango deseado de esta región espectral. Teniendo en cuenta el sencillo protocolo sintético y la amplia variedad de sustituyentes posibles, confiamos en que esta estrategia permitirá el desarrollo de nuevos materiales con emisión eficiente y estable en la zona azul del espectro para su aplicación en dispositivos optoelectrónicos y biofotónica de gran interés tecnológico.

### 1.3 Conclusiones

- 1) Se han desarrollado nuevos colorantes BODIPY con emisión fluorescente y láser en las zonas de mayor interés del espectro electromagnético: azul y roja. En la Figura 1.12 se recogen de forma esquemática algunos de los colorantes estudiados a lo largo de este capítulo encuadrando sus propiedades de emisión en el espectro visible.
- 2) Los nuevos derivados BODIPY presentan buenas propiedades ópticas, elevada eficiencia láser y buenas fotoestabilidades, tanto en fase líquida como en estado sólido, mejorando significativamente el comportamiento de los colorantes láser actualmente comercializados.
- 3) La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el esqueleto de BODIPY permiten modular de forma controlada las propiedades ópticas de los mismos en todo el espectro visible. (Figura 1.12).



**Figura 1.12** Nuevos BODIPYs sintonizables en las zonas azul y roja del espectro.

## Referencias

- [1] a) R. P. Haugland, J. Gregory, M. T. Z. Spence and I. D. Johnson, *Handbook of fluorescent probes and research products*, Molecular Probes, **2002**, p; b) R. P. Haugland and K. D. Larison, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, **1992**, p; c) in <http://probes.invitrogen.com>, Vol.
- [2] A. Treibs and F. H. Kreuzer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, 718, 208-223.
- [3] H. B. F. Dixon, A. Cornish-Bowden, C. Liebecq, K. L. Loening, G. P. Moss, J. Reedijk, S. F. Velick, P. Venetianer, J. F. G. Vliegthart and a. et, *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 779-832.
- [4] Datos obtenidos de SciFinder a 26/04/2014 empleando BODIPY como palabra clave para la búsqueda.
- [5] A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung and K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 77-88.
- [6] a) A. Loudet and K. Burgess, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2007**, 107, 4891-4932; b) G. Ulrich, R. Ziessel and A. Harriman, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 1184-1201; c) N. Boens, V. Leen and W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1130-1172; d) R. Ziessel, G. Ulrich and A. Harriman, *New J. Chem.* **2007**, 31, 496-501.
- [7] <http://www.photonicsolutions.co.uk/Exciton%20dyes.asp>
- [8] a) Y. Ni and J. Wu, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**; b) K. Umezawa, D. Citterio and K. Suzuki, *Anal. Sci.* **2014**, 30, 327-349; c) L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, L. He and W. Huang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 622-661.
- [9] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher and T. E. Rice, *Chemical Reviews* **1997**, 97, 1515-1566.
- [10] Y. Zhao, Y. Zhang, X. Lv, Y. Liu, M. Chen, P. Wang, J. Liu and W. Guo, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 13168-13171.
- [11] H. Lu, J. Mack, Y. Yang and Z. Shen, *Chemical Society Reviews* **2014**.
- [12] G. Qian and Z. Y. Wang, *Chem. - Asian J.* **2010**, 5, 1006-1029.
- [13] No toda la energía absorbida es emitida como láser ya que parte se pierde como calor en el medio y otra parte se emite espontáneamente en forma de luz que, aunque se amplifica en el medio activo no alcanza las características de emisión láser. Es la denominada "radiación ASE" que debe ser eliminada experimentalmente mediante un diafragma de apertura variable que permite seleccionar únicamente la radiación emitida en forma láser.
- [14] C. Goze, G. Ulrich and R. Ziessel, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 313-322.
- [15] Y. Yamashita, K. Ono, M. Tomura and S. Tanaka, *Tetrahedron* **1997**, 53, 10169-10178.
- [16] C. Thivierge, A. Loudet and K. Burgess, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2011**, 44, 4012-4015.
- [17] K. Umezawa, A. Matsui, Y. Nakamura, D. Citterio and K. Suzuki, *Chem. - Eur. J.* **2009**, 15, 1096-1106.
- [18] a) C. A. Gómez-Durán, I. García-Moreno, A. Costela, V. Martín, R. Sastre, J. Bañuelos, F. L. Arbeloa, I. L. Arbeloa and E. Peña-Cabrera, *Chemical Communications* **2010**, 46, 5103-5105; b) R. I. Roacho, A. Metta-Magana, M. M. Portillo, E. Peña-Cabrera and K. H. Pannell, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 4245-4250; c) J. Banuelos, F. L. Arbeloa, V. Martínez, M. Liras, A. Costela, I. G. Moreno and I. L. Arbeloa, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 3437-3445.
- [19] a) A. Iida and S. Yamaguchi, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2009**, 3002-3004; b) J. N. Moorthy, P. Natarajan, P. Venkatakrishnan, D.-F. Huang and T. J. Chow, *Org. Lett.* **2007**, 9, 5215-5218; c) R. M. Adhikari, D. C. Neckers and B. K. Shah, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 3341-3349; d) Q.-X. Tong, S.-L. Lai, M.-Y. Chan, Y.-C. Zhou, H.-L. Kwong, C.-S. Lee and S.-T. Lee, *Chem. Mater.* **2008**, 20, 6310-6312; e) B. Valeur and Editor, *Molecular Fluorescence - An Introduction: Principles and Applications, 1st Edition 2000*, Wiley-VCH, **2000**, p. 250 pp.

(approx.); f) U. Brackmann, *Lambdachrome Laser Dyes: Data Sheets*, Lambda Physik GmbH, **1994**, p.

[20] A. Costela, I. Garcia-Moreno and R. Sastre, **2001**, pp. 161-208.

[21] L. P. Hammett, *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 96-103.

[22] J. Banuelos, I. J. Arroyo-Cordoba, I. Valois-Escamilla, A. Alvarez-Hernandez, E. Pena-Cabrera, R. Hu, B. Z. Tang, I. Esnal, V. Martinez and I. L. Arbeloa, *RSC Adv.* **2011**, *1*, 677-684.



## ***Anexo al Capítulo 1***



## Controlling Optical Properties and Function of BODIPY by Using Asymmetric Substitution Effects

Jorge Bañuelos-Prieto,<sup>\*,[a]</sup> Antonia R. Agarrabeitia,<sup>[b]</sup> Inmaculada Garcia-Moreno,<sup>[c]</sup> Iñigo Lopez-Arbeloa,<sup>[a]</sup> Angel Costela,<sup>[c]</sup> Lourdes Infantes,<sup>[c]</sup> M. Eugenia Perez-Ojeda,<sup>[c]</sup> Marta Palacios-Cuesta,<sup>[b]</sup> and María J. Ortiz<sup>\*,[b]</sup>

**Abstract:** Asymmetrically substituted BODIPY analogues of the dye PM567 have been synthesised from 2-acylpyrroles and pyrroles that bear indene, fluorene or difluorene units. The type of linkage between the fluorene and the BODIPY core plays an important role in the photophysics of the BODIPY chromophore. Indeed, an aliphatic bridge gives rise to an energy-transfer process between the chromophores, whereas a vinyl spacer allows an elec-

tronic interaction between them, leading to a large red shift of the spectral bands. The laser action of the new dyes has been analysed under transversal pumping at 10 Hz repetition rate, in both liquid phase and incorporated into solid polymeric matrices. Lasing

efficiencies of up to 40 % were reached with high photostabilities with the laser output remaining at the initial level after  $1 \times 10^5$  pump pulses in the same position of the sample. The laser action of the new dyes outperforms the laser behaviour of commercial dyes that emit in the same spectral region. The replacement of fluorene by indene quenches the fluorescence and laser emission, but allows the development of an iron cation fluorescent sensor.

**Keywords:** BODIPY • fluorescence • laser chemistry • pyrroles • sensors

### Introduction

Fluorescent dyes based on 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene derivatives, known as BODIPYs, are widely used as the active media for tuneable lasers, as they have a low intersystem crossing rate, hence low triplet–triplet absorp-

tion probability over the lasing spectral region, and are very photostable. They present absorption and emission bands in the green-yellow and red part of the visible electromagnetic spectrum and a fluorescence quantum yield, in some cases, near unity.<sup>[1]</sup> Their laser action is even better than that of rhodamine dyes,<sup>[2]</sup> considered as the benchmark in laser performance.

Although the lasing action of the BODIPY dyes has been the focus of much research,<sup>[1]</sup> more effort is needed to enhance their photostability, especially for commercial applications. It has been demonstrated that the modification of the molecular structure of the chromophore system with adequate substituents can give rise to more photostable laser dyes with better photophysical and optical properties. Thus, the synthesis of analogues of the most extensively used laser dye, PM567 (Scheme 1), has been undertaken by incorporating several substituents on the pyrromethene moiety.<sup>[3]</sup>

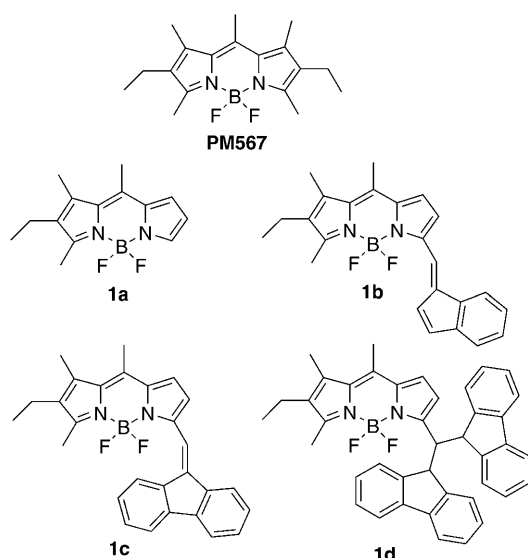
To our knowledge, the studies on BODIPY dyes with fluorene units have been limited to structurally rigid BODIPY dyes with spirofluorene moieties,<sup>[4]</sup> polymeric and copolymeric BODIPY dyes<sup>[5]</sup> and systems containing alkynylfluorene units linked to the different positions.<sup>[6]</sup> In particular systems with the indene chromophore have not been reported.

[a] Dr. J. Bañuelos-Prieto, Dr. I. Lopez-Arbeloa  
Departamento de Química Física  
UPV-EHU, Apartado 644  
48080 Bilbao (Spain)  
Fax: (+34) 946013500  
E-mail: jorge.banuelos@ehu.es

[b] Prof. A. R. Agarrabeitia, M. Palacios-Cuesta, Prof. M. J. Ortiz  
Departamento de Química Orgánica I  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense  
28040 Madrid (Spain)  
Fax: (+34) 913944103  
E-mail: mjortiz@quim.ucm.es

[c] Dr. I. Garcia-Moreno, Dr. A. Costela, Dr. L. Infantes,  
M. E. Perez-Ojeda  
Instituto de Química-Física “Rocasolano” (IQFR)  
CSIC, Serrano 119  
28006 Madrid (Spain)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201002095>.



Scheme 1. Molecular structures of commercial dye PM567 and their analogues **1a–d** synthesised in this work.

Introduction of these substituents at the appropriate position of the indacene core could be carried out by reaction over the BODIPY previously synthesised or by modification of the pyrrole starting material in the BODIPY synthesis.<sup>[3c,f]</sup> In this last method, asymmetric BODIPY dyes are usually obtained by condensation of a carbonyl-containing pyrrole with a pyrrole molecule that is not substituted at the 2-position. Linked fluorene–pyrrole and indene–pyrrole ensembles through C=C bonds are unknown. At the same time, such compounds are especially promising as starting materials for the synthesis of novel BODIPY fluorophores, owing to the extension of the overall conjugation.

The work carried out covers these aspects, and describes the synthesis of new asymmetric BODIPY dyes, PM567 analogues **1a–d**, for which fluorene and indene units have been incorporated into one of the pyrrole rings (Scheme 1). The alkyl substituted dye, **1a**, was synthesised as reference to assess the effect of incorporating fluorene and indene moieties at its 5-position.

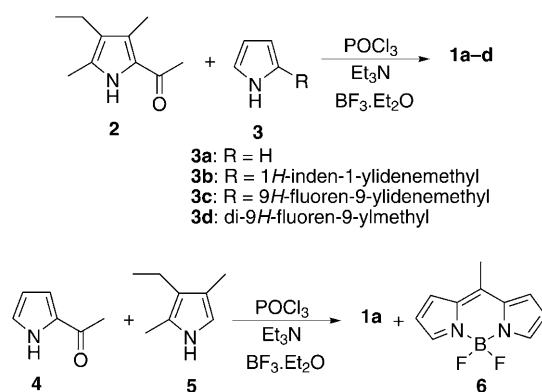
Initially, we considered if the synthetic strategy previously described by our research group, to achieve systems 1,4-unsaturated with 1-indenylidene and 9-fluorenylidene units,<sup>[7]</sup> could be employed for the synthesis of new pyrrole structure with an  $\alpha$ -position substituted for above chromophores. Surprisingly, we obtained the desired pyrroles, but with some unexpected results, and from these systems we carried out the corresponding asymmetric BODIPY dyes.

In addition, we report here the evaluation of the photophysical properties and laser behaviour of the new dyes both in solution and solid media. The BODIPY bearing two fluorene groups connected via a methylene group is found to have a very high fluorescence capacity (close to the unit, regardless of the solvent), lasing efficiency and photostability, improving the characteristics of the commercially available PM567. However, if the linkage between BODIPY and

fluorene is performed by a vinyl group the resonant interaction between both electronic clouds leads to a red emitting dye, but with lower fluorescence and lasing efficiency. On the other hand, a BODIPY bearing an indene unit, also linked by a vinyl group, shows very low red fluorescent emission, but is sensitive to the presence of iron cations in the surrounding environment. Thus, such system could be used as a fluorescent sensor.

## Results and Discussion

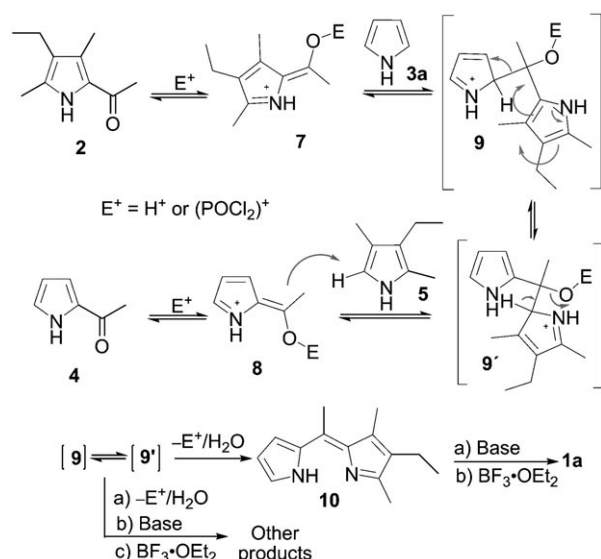
**Synthesis of the dyes:** The new asymmetric dyes **1a–d** were obtained by condensation of 2-acetyl-4-ethyl-3,5-dimethylpyrrole<sup>[8]</sup> (**2**) with a pyrrole molecule (**3**) conveniently substituted at the 2-position, following conditions previously described<sup>[9]</sup> (Scheme 2).



Scheme 2. Synthetic scheme for compounds **1a–d**.

The reaction of **2** and pyrrole with phosphorus oxychloride followed by treatment with boron trifluoride etherate in the presence of triethylamine yielded the BODIPY dye **1a** (26%) and another dye that was identified as BODIPY PM567 (4%). An alternative route from 2-acetylpyrrole (**4**) and 3-ethyl-2,4-dimethylpyrrole (**5**) yielded **1a** (46%) and traces of 8-methyl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene (**6**)<sup>[11]</sup> (Scheme 2). This route gave highest yield of the desired dye.

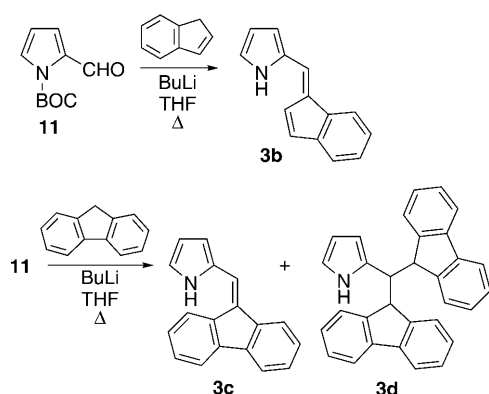
The presence of secondary products (PM567 and **6**) involves the reaction of **2** or **4** with their respective deacetylated products, however, there is not examples in the literature of deacetylation of pyrroles, but the decarboxylation reaction of 2- or 3-pyrrole carboxylic acids is very common.<sup>[10]</sup> A possible explanation involves the haloform reaction to give the corresponding carboxylic acid, which loses carbon dioxide, although, in this reaction a trichloro compound is required and its formation is speculative. An alternative mechanism for the formation of compounds prepared from compounds **2** and **3a**, or **4** and **5**, is included in Scheme 3. This mechanism is based on the facts that the formation of the sigma-complex in course of an electrophilic (het)aromatic substitution is a reversible process. Thus, the reaction of **2** or



Scheme 3. Mechanism proposed for the formation of **1a** and the secondary products.

**4** with an electrophile gives **7** and **8**, respectively, that by reaction with the corresponding pyrroles afforded the intermediates **9** and **9'**, which yield the dipyrromethene **10** the precursor of **1a**. These intermediates are essential in the proposed mechanism, and other secondary products observed in the reaction could be justified from them.

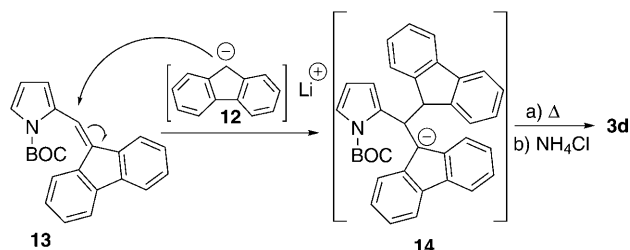
BODIPY **1b** was formed by reaction of **2** and **3b**, which was synthesised from *N*-protected pyrrole 2-carbaldehyde (**11**) and indene, as shown in Scheme 4, following the condi-



Scheme 4. Synthetic scheme for pyrroles **3b-d**.

tions previously described in our laboratory.<sup>[7]</sup> However, when compound **11** was reacted with fluorene in the same conditions, **3c** was obtained along with a new compound that was identified as **3d** (Scheme 4).

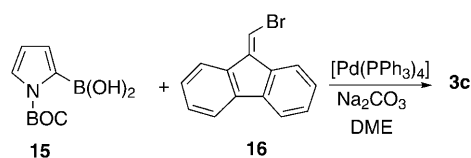
Possible mechanistic pathway for formation of **3d** involves the intermediary anion **12**, which attacks the C=C bond present in the *N*-protected pyrrole **13** (Scheme 5). This attack could be justified by the high stability of anion **14**, in



Scheme 5. Possible mechanistic pathway for formation of **3d**.

which the negative charge is delocalised by conjugation with two benzene rings.

To remove the formation of pyrrole **3d**, we carried out the synthesis of **3c** in Suzuki cross-coupling reaction between *N*-protected pyrrole 2-boronic acid (**15**) and 9-bromomethylene-9*H*-fluorene (**16**),<sup>[12]</sup> as shown in Scheme 6. In these conditions, only **3c** was obtained, although also in low yield.



Scheme 6. Alternative route for the formation of **3c**.

Pyrroles **3c** and **3d** were later employed in the synthesis of **1c** and **1d**, respectively, according to the reactions indicated in Scheme 2. Traces of PM567 were observed in both cases. The structures of BODIPY dyes **1b-d** were confirmed by single-crystal X-ray diffraction (Figure 1 and the Supporting Information).

**Photophysical properties:** The asymmetrically alkyl-substituted **1a** dye shows some of the typical photophysical fea-

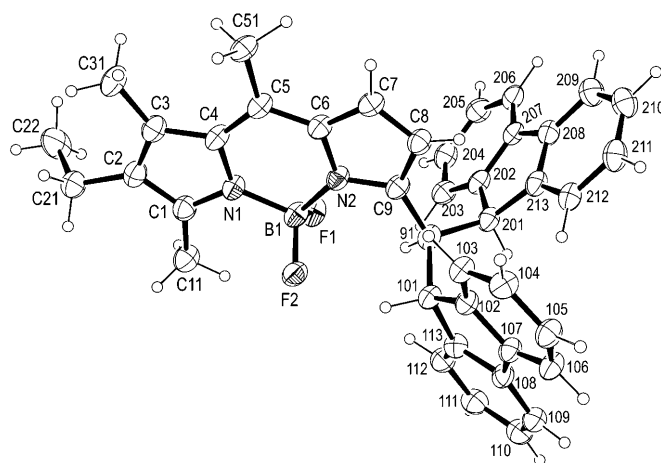


Figure 1. ORTEP representation of the molecular structure of BODIPY **1d**.

Table 1. Photophysical properties, under visible excitation, of **1a**, **1c** and **1d** in apolar, polar and polar/protic solvents.

Solvent	$\lambda_{\text{abs}}^{[a]}$	$\epsilon_{\text{max}}^{[b]}$	$\lambda_{\text{flu}}^{[a]}$	$\phi^{[c]}$	$\tau^{[d]}$	$k_{\text{fl}}^{[e]}$	$k_{\text{nr}}^{[e]}$	$\Delta\nu_{\text{St}}^{[f]}$
<b>Dye 1a</b>								
F3-ethanol	492.0	1.9	511.0	0.75	6.17	1.21	0.40	760
methanol	495.5	2.5	512.5	0.76	5.78	1.31	0.41	660
ethanol	497.0	2.5	513.5	0.84	5.73	1.46	0.28	630
acetone	495.0	2.2	512.5	0.79	5.66	1.39	0.37	690
ethyl acetate	496.0	2.5	512.5	0.84	5.57	1.50	0.28	650
c-hexane	504.0	3.3	515.0	0.96	5.46	1.75	0.07	735
<b>Dye 1c</b>								
F3-ethanol	566.5	4.1	600.5	0.33	2.28	1.44	2.93	995
methanol	575.4	5.0	603.5	0.48	3.20	1.50	1.62	805
ethanol	579.0	5.1	605.5	0.58	3.67	1.58	1.14	765
acetone	574.0	4.3	603.5	0.47	2.91	1.61	1.82	855
ethyl acetate	578.0	5.0	605.5	0.65	3.78	1.72	0.92	790
c-hexane	589.0	5.6	611.5	0.73	4.07	1.79	0.66	615
<b>Dye 1d</b>								
F3-ethanol	510.5	2.1	523.5	1.0	6.26	1.59	0	490
methanol	512.5	3.9	525.0	0.99	5.76	1.72	0.02	455
ethanol	514.0	4.2	526.0	0.93	5.59	1.66	0.12	440
acetone	511.5	3.9	525.5	0.99	5.61	1.76	0.02	480
ethyl acetate	513.5	4.0	525.0	0.94	5.47	1.72	0.11	450
c-hexane	521.0	5.0	529.5	0.97	5.20	1.86	0.05	320

[a] Absorption ( $\lambda_{\text{abs}}$ ) and fluorescence ( $\lambda_{\text{flu}}$ ) wavelength ( $\pm 0.5$  nm). [b] Molar absorption ( $\epsilon_{\text{max}}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). [c] Fluorescence quantum yield ( $\phi$ ,  $\pm 0.05$ ). [d] Fluorescence lifetime ( $\tau$ ,  $\pm 0.05$  ns). [e] Radiative ( $k_{\text{fl}}$ ) and non-radiative ( $k_{\text{nr}}$ ) rate constants ( $10^8 \text{ s}^{-1}$ ). [f] Stokes shift ( $\Delta\nu_{\text{St}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ).

tures of the BODIPY chromophore,<sup>[1a]</sup> as can be derived from the corresponding data summarised in Table 1. The absorption and fluorescence bands in the green-yellow part of the visible have been characterised by slight hypsochromic shifts with the solvent polarity and high fluorescence quantum yields ( $\phi$  up to 0.95 in apolar media) and lifetime ( $\tau$  around 5–6 ns). The fluorescence lifetime increases with the solvent polarity, while the fluorescence quantum yield decreases. Such evolutions are owed to a decrease of  $k_{\text{fl}}$  (correlated with the diminution of  $\epsilon_{\text{max}}$ ) and a small increase of  $k_{\text{nr}}$  in the polar media (Table 1). This behaviour, is not usual in symmetric BODIPY,<sup>[1a]</sup> and could be ascribed to the asymmetric substitution pattern affecting the transition dipole moment. Then, the alkyl substituted **1a** dye will be used as reference to discuss the effect of incorporating fluorene and indene moieties at its 5 position.

**Fluorene-BODIPY derivatives:** The inclusion of two fluorene units at the same position of the BODIPY core, both separated from the chromophore by a methylene group (**1d**), induces a modest bathochromic shift (around 15 nm) of the absorption and fluorescence spectral bands, with regard to the parent asymmetric **1a**, as illustrated in Figure 2. Such a shift should be a result of the donor inductive effect of the branched substituent. The evolution of the spectral bands with solvent characteristics follows the above described hypsochromic shift with the solvent polarity. The inspection of the photophysical data of this novel multichromophoric dye under visible excitation (Table 1), reveals that the inclusion of the fluorene units improves the fluorescence capacity of the BODIPY chromophore, giving rise to fluo-

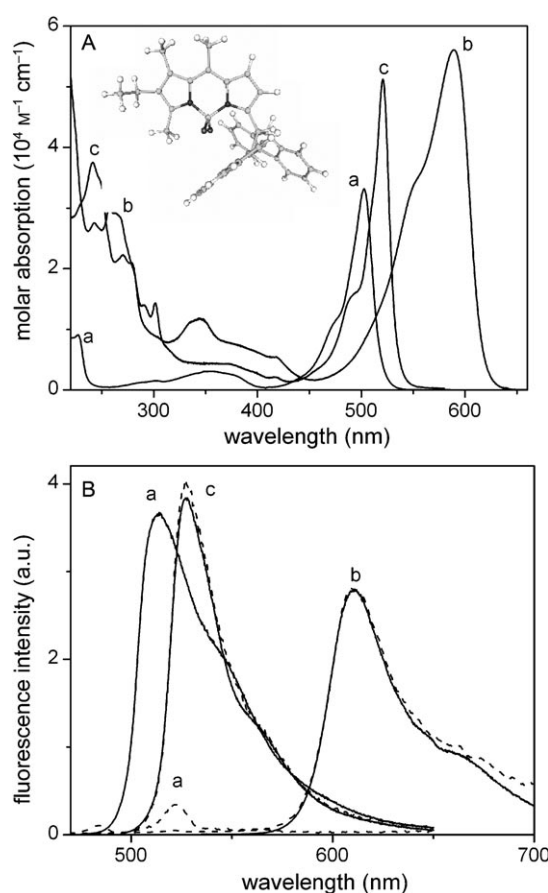


Figure 2. A) UV/Vis absorption spectra of **1a** (a), **1c** (b) and **1d** (c) in diluted solutions of c-hexane. B) Fluorescence spectra under visible excitation (solid line) and under UV excitation (dashed line). Inset A: optimised ground state geometry of **1d**.

rescence quantum yield close to the unity, independent of the considered solvent.

Quantum-mechanical calculations propose a ground state geometry in which the BODIPY core and the fluorene units are disposed in different planes, nearly perpendicular between each other (inset Figure 2A). Such a conformation avoids any electronic interaction between them. Indeed, the simulation of the absorption transition predicts a bathochromic shift of around 10 nm and a similar transition probability, with respect to **1a**. Previous works pointed out that the inclusion of bulky groups with free rotation enhances the internal conversion processes, owing to the vibrational coupling, decreasing the fluorescence capacity of the dye.<sup>[13]</sup> However, in the present case, the bulkiness and disposition of the fluorene moieties, as well as their special proximity, leads to a high steric hindrance, which should hinder their rotation and hence the non-radiative pathway. Such constrained structures are characterised by improved fluorescence capacities,<sup>[3d,14]</sup> as is the present case of **1d** (Table 1).

The inspection of the UV part of the absorption spectrum of the multichromophoric BODIPY-fluorene triad reveals the presence of new bands not observed for **1a**, and hence assigned to the fluorene entity (Figure 2A), since in addition

they match perfectly with its spectrum.<sup>[15]</sup> Therefore, the whole absorption spectrum of the **1d** dye can be considered as the sum of the bands of the BODIPY core and the fluorene moiety (Figure 2A), confirming again the absence of any intermolecular interaction between both aromatic entities, at least in the ground state (Figure 2A). On the other hand, the excitation in the UV, where just the fluorene chromophore absorbs light, leads only to the visible emission of the BODIPY dye (Figure 2B), without trace of the fluorene emission, which typically is high ( $\phi \approx 0.77$ ).<sup>[15]</sup> Consequently, in the multichromophoric **1d** system, an efficient intramolecular excitation energy transfer (intra-EET) process takes place from the two donor fluorenes to the acceptor BODIPY core, quenching the emission of the fluorene in favour of the bright visible emission of the BODIPY. Thus, a very high “virtual” Stokes shift is achieved since the fluorescence detection region (Vis) can be monitored far away from the excitation (UV), reducing background scatter interferences.

Typically in dyads consisting of BODIPY moieties acting as donor or acceptor in the intra-EET process, two different mechanisms are responsible of the energy transfer:<sup>[16]</sup> the through-bond and the through-space mechanisms (i.e., the so-called Förster dipole–dipole coupling).<sup>[17]</sup>

The through-bond mechanism demands an orbital overlap between the donor and the acceptor (electronic coupling).<sup>[18]</sup> It has been observed with BODIPY cores acting as acceptors and bearing donor groups (i.e., polyphenyl) directly linked at *meso* position,<sup>[19]</sup> which is characterised by its high electronic density in the LUMO state. Such a mechanism has also been observed with unsaturated bridges or spacers (ethynyl) connecting the donor (anthracene) and the acceptor BODIPY core.<sup>[16c]</sup> In the present **1d** triad, the fluorene units are separated by two single bonds from the BODIPY core and the through-bond energy transfer should drastically decrease with the distance between the donor and the acceptor. Therefore, such mechanism does not seem to be the main cause of the observed efficient intra-EET process in **1d**.

The through-space process requires mainly a spectral overlap between the fluorescence band of the donor and the absorption band of the acceptor (dipole–dipole coupling) on the basis of the Förster mechanism.<sup>[20]</sup> In our case, the fluorescence band of the fluorene (placed around  $\lambda = 300$  nm) hardly overlaps with the  $S_0 \rightarrow S_1$  absorption band of the BODIPY core (place around  $\lambda = 500$  nm), reducing the probability of the direct energy-transfer process through dipole–dipole coupling between both states. However, the fluorene emission overlaps with the more energetic absorption bands of the BODIPY chromophore ( $S_0 \rightarrow S_2$  and  $S_0 \rightarrow S_3$  placed around  $\lambda = 350$  nm). Aside from the lower absorption probability of such transitions, it seems that such overlap is enough to allow the energy-transfer process via this mechanism. Indeed, Ziessel and co-workers have reported intra-EET processes in multichromophoric systems consisting in pyrene, terpyridine and a fluorene-derivative attached to different positions of the BODIPY core and even replac-

ing the fluorine atoms.<sup>[6a]</sup> Owing to the spectral overlap of the aromatic substituent fluorescence with the  $S_0 \rightarrow S_2$  and  $S_0 \rightarrow S_3$  absorption bands of the boradiazaindacene core, the proposed mechanism is a Förster type.

On the other hand, the inclusion of just one fluorene, also at the 5 position, but separated from the BODIPY core by a vinyl group (**1c**), leads to an important bathochromic shift (up to 100 nm) and a broadening of the spectral bands, mainly in absorption (Figure 2). In fact, quantum mechanical simulation of the absorption transition also predicts an important shift of the absorption band together with an increase in the oscillator strength (area under the curve), corroborating the observed widening of the absorption band. These changes are attributed to the extension of the electronic  $\pi$  system through the delocalised substituent. Indeed, the corresponding HOMO and LUMO contour maps presented in Figure 3 confirm that the electronic cloud of the

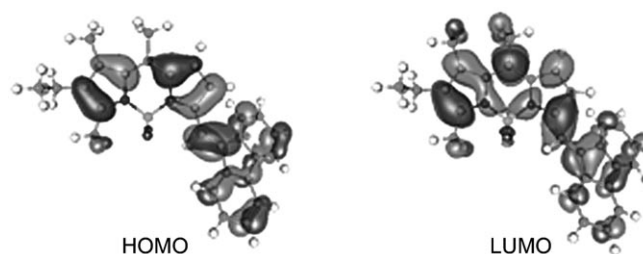


Figure 3. Electronic density of the HOMO and LUMO states of the **1c** dye.

BODIPY core is extended to the fluorene unit through the linking double bond, leading to a cyanine like delocalised  $\pi$  system in the whole molecule. Therefore, the type of spacer between the BODIPY and fluorene plays an important role in the photophysics of the resulting multichromophoric dye. Thus, when a saturated spacer is used (**1d**) the resonant interaction between them is avoided leading to electronically independent chromophores. However, an unsaturated bridge allows the electronic coupling between them, resulting in a delocalised new  $\pi$  system through the whole molecule (Figure 3).

The direct excitation of the  $S_0 \rightarrow S_1$  absorption band provides a red fluorescence emission (around 600–610 nm, Figure 2B). Besides, while the absorption probability is enhanced by the extended conjugation, both the fluorescence quantum yield and the lifetime decrease with respect to the parent **1a**, due to an increase of the non-radiative deactivation rate constant (Table 1). It is known that one of the mayor drawbacks of red-emitting dyes is their lower fluorescence capacity, since the ground and excited state are energetically closer favouring: on one hand, the radiative deactivation of the emitting state (the delocalisation of the fluorene leads to higher  $k_{\text{fl}}$  values than **1a**, as correspond to the augmentation of  $\epsilon_{\text{max}}$ , Table 1); but, on the other hand and mainly, the internal conversion probability is largely enhanced (higher  $k_{\text{nr}}$  values for **1c** than for the reference **1a**

compound), since the vibrational coupling probability between the electronic excited and ground state increases, favouring the internal conversion processes. Figure 3 shows that upon excitation the electronic density seems to shift from the fluorene (HOMO) to the BODIPY core (LUMO), reducing also the extension of the  $\pi$  system. The conformational changes of the unsaturated spacer connecting the BODIPY and the fluorene (i.e., rotation of this group) could participate in the augmentation of the non-radiative deactivation. As result, the emission ability is lower in the red emitting **1c**.

The photophysical properties of **1c** are clearly more sensitive to the solvent characteristics than those of the other fluorene derivative **1d** (Table 1). Thus, not only the hypsochromic shift of the spectral bands is bigger, but also the fluorescence quantum yield and lifetime clearly decrease, from *c*-hexane to alcohols, owing to an increase in the non-radiative deactivation rate constant. Typically, the fluorescence capacity of alkyl-BODIPYs shows a low dependency on the physicochemical properties of the solvent, being slightly higher in polar/protic environments.<sup>[1c]</sup> To get a deeper insight in the solvent effect on  $k_{nr}$ , a multilinear regression analysis has been performed, for which a physicochemical property is simultaneously correlated with different solvent properties.<sup>[21]</sup> Generally the solvent properties, which affect the photophysics of fluorophores, are those resulting from general or nonspecific interactions (polarity/polarisability) and those arising from specific interactions (acidity and basicity). These properties can be described by the Taft solvent scales ( $\pi^*$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ , respectively).<sup>[22]</sup> The corresponding regression is shown in Figure 4. The linear correlation is good ( $r=0.992$ ) and the fitting results indicate that the increase of  $k_{nr}$  is exclusively owed to an increase in the solvent polarity/polarisability. Recently, however, Catalan and co-workers have claimed that the term describing the solvent general interactions needs to be split into two different scales; one for the polarity (SdP) and another for polarisability (SP).<sup>[23]</sup> The solvent acidity and basicity are described by the SA and SB scales, respectively.<sup>[23]</sup> The linear fit with these four solvent scales is more accurate ( $r=0.99999$ ) and confirms that the solvent polarity ( $c_{SdP}=1.977$ ) favours the non-radiative pathway, whereas the influence of the specific interactions is negligible (Figure 4). Nevertheless, the component responsible for the evolution of  $k_{nr}$  is clearly the solvent polarisability ( $c_{SP}=-6.063$ ). Thus, an increase of the solvent polarisability leads to a decrease of the non-radiative deactivation improving the fluorescence capacity. Indeed the evolution of  $k_{nr}$  (from  $0.66 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$  in *c*-hexane to  $2.93 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$  in trifluoroethanol) perfectly matches that of the solvent polarisability (SP from 0.683 to 0.543, respectively, Figure 4). In solvents of high polarisability the interactions between the  $\pi$  system of the dye and the solvent should be favoured, which leads to a less flexible molecular structure, but improves the fluorescence capacity of the dye.

In spite of the resonant interaction between the fluorene and the BODIPY unit, the UV absorption bands of the fluorene are still observed, and their direct excitation leads ex-

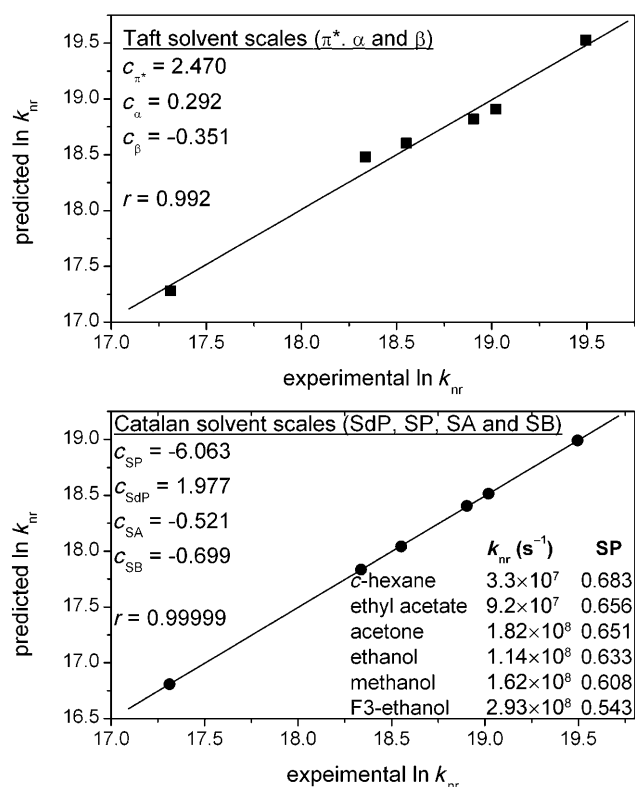


Figure 4. Multilinear regression fit of the non-radiative deactivation rate constant of **1c** on the basis of the Taft<sup>[22]</sup> solvents scales ( $\pi^*$ ,  $\alpha$  and  $\beta$  describing the polarity/polarisability, acidity and basicity, respectively) and the Catalan<sup>[23]</sup> solvent scales (SdP, SP, SA and SB describing the polarity, polarisability, acidity and basicity, respectively).

clusively to the red emission of **1c**, indicating the presence of an intra-EET process that give rise to a large “virtual” Stokes shift. In this way, this bichromophoric dye converts ultraviolet light into red light. As the spacer between the donor fluorene and the acceptor BODIPY core favours the orbital overlap between them, both the through-bond and the through-space mechanism likely contribute to the intra-EET process.

**Indene-BODIPY diad:** The replacement of the fluorene unit by an indene moiety yields the compound **1b**. Its ground state geometry reveals that indene is disposed in a more coplanar disposition (twisting angle  $20^\circ$ , X-ray =  $8^\circ$ ) with respect to the BODIPY core than fluorene ( $30^\circ$ , X-ray =  $36^\circ$ ). The higher planarity of the indene derivative predicted by the quantum mechanical simulation in gas phase qualitatively confirms the observed by X-ray diffraction in solid-state structures. Excitation gives rise to a more planar geometry with twisting angles of  $12^\circ$  for **1b** and  $21^\circ$  for **1c**. Such higher coplanarity in the excited state can also be derived from the HOMO and LUMO contour maps, which indicate an electronic density shift from indene to BODIPY, similar to that observed for its fluorene counterpart (Figure 3). Therefore, the indene derivative **1b** is also characterised by an extended conjugated  $\pi$  system, which gives rise to red-



shifted spectral bands (absorption and fluorescence band centred at  $\lambda = 591$  and  $596$  nm, respectively in *c*-hexane). However, although the absorption probability remains high ( $\epsilon_{\text{max}}$  around  $6\text{--}8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), the fluorescence quantum yield is very low, lower than 0.02. Moreover, the fluorescence decay curve is analysed by a biexponential fit consisting in a very short and dominating lifetime (19.4 ps; 95.5 %), and a minority lifetime (4.2 ns; 4.5 %), similar to typical BODIPY. Therefore, the bounding of indene to BODIPY results in a drastic increase in the non-radiative processes. Singlet oxygen generation experiments reveal that the intersystem crossing probability of **1b** remains low, as is typical of BODIPYs, owing to its quasi-aromatic  $\pi$  system.<sup>[24]</sup> Furthermore, viscous solvents (i.e., ethylene glycol) do not improve the photophysical behaviour of **1b**, discarding the free rotation of the indene group as the reason of the lack of fluorescence of this derivative. Thus, the non-radiative pathway should be assigned to internal conversion processes.

Previously, it has been reported that fluorene itself is characterised by a high fluorescence quantum yield ( $\phi$  around 0.7),<sup>[15]</sup> and its linkage to BODIPY leads to a highly fluorescent laser dye. Indene, however, is characterised by a poor fluorescence signal ( $\phi$  around 0.005), because its excited states are described as biradicals.<sup>[25]</sup> Moreover, high level computational studies have simulated the potential energy curve of the excited state looking for conical intersections between  $S_1$  and  $S_0$  to account for the non-radiative processes of indene.<sup>[26]</sup> They found that the main mechanism involved is a fast and efficient internal conversion process. Therefore, the linkage of indene to BODIPY, via a vinyl group, results in a negative effect on the fluorescence capacity of the BODIPY chromophore, owing, probably, to the internal conversion of the indene group.

Although **1b** is not useful for lasing applications, it is widely known that cyclopentadienyl and its derivatives (indene) form stable complexes with iron cations, for example ferrocenes.<sup>[27]</sup> Moreover, there are several fluorescent sensors based on BODIPY, commonly bearing crown ethers, to detect the presence of cations, depending of its size.<sup>[28]</sup> The binding of the cation deactivates the quenching of the crown ether (i.e., photoinduced electron transfer) and restores the fluorescence emission of the BODIPY (switches on/off). Thus, we decided to explore this possibility and make a titration experiment adding  $\text{Fe}^{3+}$  to a solution of **1b**. Although the absorption spectra remains nearly unaltered, a progressive increase of the fluorescence intensity with  $\text{Fe}^{3+}$  content was observed, as is illustrated in Figure 5. Commonly the presence of a paramagnetic ion, like  $\text{Fe}^{3+}$ , enhances the spin-orbit coupling, and hence the intersystem crossing probability, quenching the fluorescence emission. However, in the present case the interaction between iron cation and indene seems to decrease its negative effect on the BODIPY emission. Indeed, for low amounts of  $\text{Fe}^{3+}$  the fluorescence intensity is very sensitive to the presence of this cation (Figure 5). For higher concentrations ( $> 4 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) the fluorescence intensity enhancement is not so prominent, but a linear relationship is obtained, which could

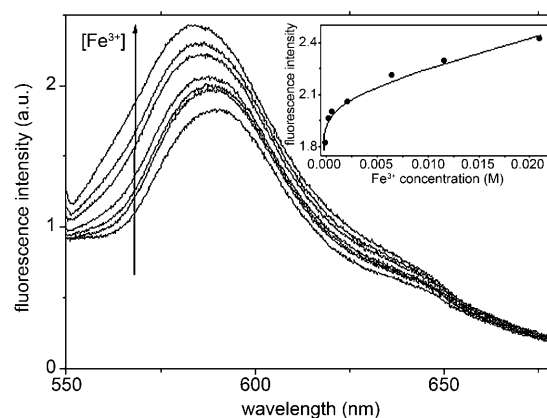


Figure 5. Fluorescence spectra of **1b** for different amounts of  $\text{Fe}^{3+}$ . Inset: Evolution of the fluorescence intensity with  $\text{Fe}^{3+}$  concentration.

be used as a calibration curve to determine the concentration of the iron cation in the solution (Figure 5). Thus, **1b** should behave as a fluorescence sensor of  $\text{Fe}^{3+}$  allowing monitor quantitatively its concentration in the surrounding environment of the indene-BODIPY derivative.

### Lasing properties

**Liquid phase:** Initially, the laser derivatives were pumped at the usual wavelength of  $\lambda = 532$  nm. In our experimental setup an optical density of the dye samples of approximately 20 determines that the incoming pump radiation penetrates the sample (i.e., is absorbed) a depth similar to that to the thickness of the pump stripe at the input face of the cell onto which the pumping radiation is focused (about 0.3 mm). This gives rise to an emitted beam with near circular-cross-section and enhances the laser efficiency (ratio between the energy of the dye laser output and the energy of the pump laser incident on the sample surface).

The low absorption of the new dyes at  $\lambda = 532$  nm demanded the preparation of highly concentrated solutions to reach the required optical density. This resulted in solubility problems, as well as an aggregation of dye molecules, which prevented the laser action or, in the best cases, decreased the lasing efficiency to a mere 0.6 %. Thus, we proceeded to analyse the laser behaviour of the new dyes pumped transversely with radiation with wavelength near to the absorption maximum of the dyes.

Under these experimental conditions, broad-line-width laser emission with pump threshold energy of approximately 0.8 mJ, beam divergence of approximately 5 mrad and pulse duration of approximately 8 ns FWHM was obtained from the new dyes when placed in a simple plane-plane non-tunable resonator. The dependence of the laser action of the new BODIPY derivatives on the corresponding dye concentration was analysed in ethyl acetate varying the optical densities while keeping constant all the other experimental parameters. The lasing behaviour of the new dyes, **1a**, **c** and **d** (Figure 6), shows good correlation with their photophysical properties in dilute solutions. 1) the asymmetric substitution

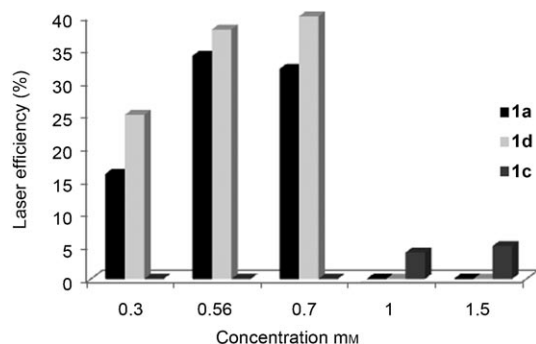


Figure 6. Lasing efficiencies of the new dyes **1a** (back bars), **1c** (dark grey bars) and **1d** (grey bars) in ethyl acetate as a function of the dye concentration.

in the BODIPY core (dye **1a**) induces highly efficient (up to 34%) laser emission peaked at approximately 530 nm, which correlates with a high fluorescence quantum yield; 2) the presence of one fluorene group red-shifts the laser emission up to  $\lambda=610$  nm and reduces drastically the conversion efficiency; 3) the presence of two fluorene groups at 3-position of BODIPY core allows to recover a high efficient (up to 40%) laser action centred at approximately 540 nm.

The actual effect of the solvent on the dye laser action was analysed in solutions of polar nonprotic and polar protic solvents at the dye concentrations that optimised the corresponding laser efficiency of each derivative. The low solubility of these new dyes in apolar solvent prevented us from producing too highly concentrated solutions that were required for some of the laser experiments under the pumping conditions selected in the present work. Once again, photophysical and laser properties are correlated: the higher the fluorescence quantum yield is, the higher the lasing efficiency becomes. Thus, the laser action of **1a** dye in acetone exhibits an efficiency of 28%, lower than those registered in ethanol (37%) and ethyl acetate (34%). The substitution of ethyl acetate by acetone as **1d** solvent increases the laser efficiency, which reaches a value of 43%.

To analyse the lasing photostability of these dyes, some studies were carried out under experimental conditions identical to those selected to irradiate the fluorophores embedded in solid polymeric matrices, which will allow later comparison of their stability in liquid and solid phases under laser irradiation. The new dyes were dissolved in ethyl acetate and their concentrations were adjusted so that the laser action was optimum in all cases. Because the irradiated volume of the solid samples in our experimental conditions was estimated to be 10  $\mu$ L, capillary tubes were utilised, into which the liquid solutions were incorporated, to reproduce the geometry of the irradiated volume in the solid samples and, thus, maintaining the same laser pump conditions in both cases.

Although the optical quality of the capillary prevents laser emission from the dyes, information about their photostabilities can be obtained by monitoring the decrease in

laser-induced fluorescence intensity, under transversal excitation of the capillary, as a function of the number of pump pulses. The fluorescence emission was monitored perpendicular to the exciting beam, and its collection and analysis was carried out with the same set-up selected to characterise the laser emission from dyes incorporated into solid samples. The results obtained from the most efficient dyes, **1a** and **1d**, are plotted in Figure 7. The new dyes result to be highly

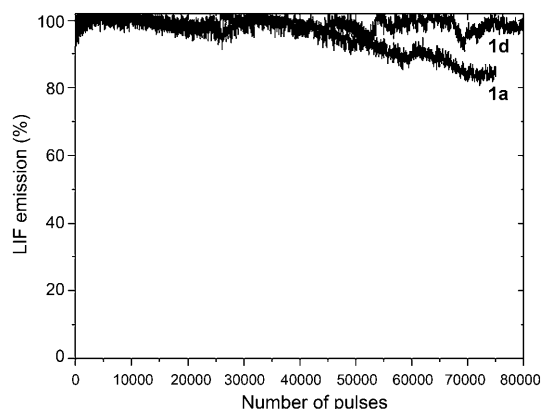


Figure 7. Normalised laser-induced fluorescence emission as a function of the number of pump pulses at 10 Hz repetition rate for **1a** and **1d** ethyl acetate solutions.

photostable since, after 80000 pump pulses at 10 Hz, the dye **1d** maintains its initial laser output without sign of degradation, while the laser emission of **1a** derivative drops by less than 10% with respect to its initial output. Once more, this laser behaviour can be related to the analysed photophysical properties: the lower the non-radiative rate constant is the higher the lasing photostability.

To put the present results in perspective, the lasing parameters of well-known dyes, such as Coumarin 540 A, which lase in the same spectral region as the studied dyes, were also measured under similar conditions. The new asymmetric dyes **1a** and **1d** exhibit laser efficiencies and photostabilities higher than the commercial Coumarin 540 A, which lases at  $\lambda \approx 535$  nm with an efficiency of 25% and with a drop in the laser emission of more than 65% after 30000 pump pulses at 10 Hz.

**Solid-state experiments:** The experiments were carried out by using samples with the dye concentration that produced the highest lasing efficiency in ethyl acetate solution ( $5\text{--}7 \times 10^{-4}$  M, depending on the dye). Methyl methacrylate (MMA) was chosen as the main monomeric component of the formulations, because this ester mimics ethyl acetate, the solvent for which the studied dyes gave rise to high lasing efficiencies. As discussed above, improvement in the lasing efficiency of **1a** dye was determined in protic polar solvents, such as ethanol. In the solid samples, the polarity of the polymeric medium can be modulated by use of appropriate copolymers. Thus, copolymers of MMA with monomers

functionalised with polar groups, such as 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) were prepared in volumetric proportions ranging from 10/0 (polymethyl methacrylate (PMMA) homopolymer) to 0/10 (poly2-hydroxyethyl methacrylate (PHEMA) homopolymer).

Broad-band and efficient laser emission, with beam divergence of approximately 5 mrad and pulse duration of approximately 5 ns FWHM, was registered from the dyes incorporated as true solutions into the solid homopolymer PMMA (Table 2). No significant differences were observed

Table 2. Laser properties<sup>[a]</sup> of the new dyes incorporated in solid matrices.

Material	Eff [%]	$\lambda_{la}$ [nm]	<i>I</i> [%]
<b>1d</b> /PMMA	30	542	100
<b>1a</b> /PMMA	20	531	94
<b>1a</b> (MMA/HEMA 1/1)	23	531	93
<b>1a</b> /PHEMA	25	532	85

[a] Eff: energy conversion efficiency,  $\lambda_{la}$ : peak wavelength of the laser emission; *I*: Intensity of the dye laser output after 100000 pump pulses in the same position of the sample with respect to its initial intensity  $I_0$ ,  $I(\%) = (I/I_0) \times 100$ , at 10 Hz repetition rate.

in the wavelength of the maximum laser emission of each dye between their liquid and solid solutions. The lasing efficiencies of the solid materials, in the range of 20–30 %, are lower than those of the corresponding liquid solutions. In this regard, it has to be taken into account that the finishing of the surface of the solid samples relevant to the laser operation was not laser-grade, so that even higher lasing efficiencies are to be expected with laser-grade surfaces.

The lasing stabilities of the dye-doped solid matrices were studied by following the evolution of the laser output as a function of the number of pump pulses in the same position of the sample, at a 10 Hz repetition rate. Once again, both dyes exhibit a high photostability although the presence of PHEMA in the matrix degrades the lasing stability of the **1a** dye. Although the photobleaching of dyes can occur by several different mechanisms and, from a general point of view, can be considered to be quite complex, photo-oxidation, in which chemically reactive singlet oxygen is formed by sensitisation of ground-state triplet oxygen molecules by triplet state dyes,<sup>[29]</sup> is maybe the degradation mechanism most often referred to and the one with strongest relevance. The high content of HEMA in the matrix plays an important role in the photodegradation processes of dye **1a**, probably as a consequence of the higher oxygen permeability in the final material. In addition, an increase of the concentration of HEMA comonomer leads to a more plastic material, with lower elastic limit and better damage resistance.<sup>[30]</sup> However, as the internal plasticisation increases, the protecting “polymer cage” that surrounds the dye groups weakness (the polymer becomes less rigid) and, as a result, the chromophore could be easily bleached.<sup>[31]</sup>

## Conclusion

In summary, new asymmetric BODIPY–indene and BODIPY–fluorene dyes have been successfully synthesised by using a conventional method. The key aspect of these syntheses is obtaining the corresponding 2-substituted pyrrole precursors, which are described for the first time in this work. These BODIPY–fluorene systems, in which both moieties are electronically decoupled, give rise to a highly fluorescent laser dye, which improves the photophysical and lasing properties of the related alkyl-BODIPYs. However, if the bridge connecting both entities allows a resonant interaction between them, a red emitting dye is obtained. In both cases, an intra-EET process takes place from fluorene to BODIPY core, which allows obtaining bright Vis emission under UV or Vis excitation. Thus, these dyes are versatile and efficient as active media in dye lasers, and could be applied in biology since the excitation and emission region are far away avoiding background interferences in the fluorescence signal detection. On the other hand, the attachment of indene to the BODIPY core, instead of fluorene, induces a drastic decrease in the fluorescence ability, but opens the way to development of a fluorescent sensor to detect iron cations.

## Experimental Section

**General:** Starting materials and reagents used in the preparation of BODIPY dyes **1a–d** are commercially available unless their synthesis is described. The solvents were dried and distilled, before use. Spectral data of the known compounds were in accordance with the literature data. Flash column chromatography was performed by using silica gel Merck 60 (230–400 mesh). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy was recorded by using a Bruker Avance AV-500 spectrometer (500 MHz for <sup>1</sup>H and 125 MHz for <sup>13</sup>C), a Bruker Avance-DPX-300 spectrometer (300 MHz for <sup>1</sup>H and 75 MHz for <sup>13</sup>C) and a Bruker-AC-200 spectrometer (200 MHz for <sup>1</sup>H and 50 MHz for <sup>13</sup>C). All spectra were recorded in CDCl<sub>3</sub>. <sup>1</sup>H chemical shifts are reported in ppm relative to tetramethylsilane ( $\delta$  = 0.00 ppm), using the residual solvent signal as the internal reference. The <sup>13</sup>C chemical shifts are reported in ppm with CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  = 77.67 ppm) as the internal standard. Chemical shift multiplicities are reported as s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet and m = multiplet. IR spectra (in cm<sup>−1</sup>) were recorded by using a Bruker Tensor-27-FTIR spectrophotometer. Melting points were determined in open capillaries and are uncorrected. Mass spectra were registered by electron impact at 70 eV by using a VG12–250 spectrometer. High resolution mass spectra were determined by electrospray ionisation in the positive mode (ESI<sup>+</sup>) by using a Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 6520 (Agilent Technologies). Combustion analyses (C, H, N) were obtained by using a LECO CHNS-932 apparatus at the Universidad Complutense de Madrid analysis services and were within 0.4 % of the theoretical values.

**General procedure for the synthesis of asymmetric BODIPYs 1a–d:** To a solution of 2-acetyl-4-ethyl-3,5-dimethylpyrrole<sup>[8]</sup> (**2**) (1 equiv) in CHCl<sub>3</sub> was added POCl<sub>3</sub> (1.1 equiv), and the mixture was stirred for 30 min at RT. Then the corresponding pyrrole **3** (1 equiv) in CHCl<sub>3</sub> was added and the resulting solution was stirred for 12 h at RT. Triethylamine (1 equiv) was added, followed by an addition of BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (1 equiv), and stirring was continued for 3–4 h before being quenched with 10 % aqueous HCl and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic extracts were washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness. The dyes were isolated and purified by flash chromatography on silica gel.

**Synthesis of 2-ethyl-4,4-difluoro-1,3,8-trimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (1a):**

Compound **1a** was obtained through two synthetic routes: **Method A:** 2-Acetyl-4-ethyl-3,5-dimethylpyrrole (**2**) (455 mg, 2.8 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (20 mL),  $\text{POCl}_3$  (0.3 mL, 3.3 mmol), pyrrole (**3a**) (0.2 mL, 2.8 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (10 mL), triethylamine (0.4 mL, 2.8 mmol) and  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.3 mL, 2.8 mmol) were reacted. Flash chromatography using hexane/EtAcO (98:2) afforded **1a** (190 mg, 26%) as a red solid and PM567 (35 mg, 4%).

**Compound 1a:** m.p. 155.5–156.0°C;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.47 (brs, 1H, CH), 6.93 (d,  $J$  = 3.6 Hz, 1H, CH), 6.31 (dd,  $J$  = 3.6, 2.1 Hz, 1H, CH), 2.48 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.46 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.33 (q,  $J$  = 7.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.24 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.97 ppm (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 160.3 (C=N), 140.8 (C), 140.4 (2 C), 136.6 (CH), 135.1 (C), 134.1 (C), 122.7 (CH), 114.9 (CH), 17.0 ( $\text{CH}_2$ ), 16.5 ( $\text{CH}_3$ ), 14.5 ( $\text{CH}_3$ ), 14.0 ( $\text{CH}_3$ ), 13.1 ppm ( $\text{CH}_3$ ); IR (neat):  $\tilde{\nu}$  = 1568 (C=N), 1455  $\text{cm}^{-1}$  (C=C); MS:  $m/z$  (%): 262 (38) [ $M$ ] $^+$ , 247 (100), 227 (16); HR-MS-ESI $^+$ : calcd for ( $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{BF}_2\text{N}_2 + \text{H}^+$ ): 263.1532; found: 263.1428.

**Method B:** 2-Acetylpyrrole (1 g, 9.2 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (20 mL),  $\text{POCl}_3$  (1 mL, 10.1 mmol), 3-ethyl-2,4-dimethylpyrrole (1.13 g, 9.2 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (20 mL), triethylamine (1.3 mL, 9.2 mmol) and  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (1.1 mL, 9.2 mmol) were allowed to react. Flash chromatography using hexane/EtAcO (98:2) afforded **1a** (1.1 g, 46%) and traces of BODIPY **6**.<sup>[11]</sup>

**Synthesis of 2-[(E)-1H-inden-1-ylidenemethyl]-1H-pyrrole (3b):** To a solution of indene (539 mg, 4.6 mmol) in dry THF (20 mL) at 0°C and under an argon atmosphere, was added dropwise a solution of *n*BuLi (3.2 mL, 1.6 M in hexane). The reaction mixture was stirred at RT for 1 h and then, a solution of **11** (1 g, 5.1 mmol) in dry THF (20 mL) was added. The mixture was refluxed for 4 h to complete the reaction and allowed to warm at RT before being quenched with saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The combined organic phases were washed with  $\text{H}_2\text{O}$ , saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine. The extract was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated to dryness. Flash chromatography using hexane/EtAcO (98:2) afforded **3b** (145 mg, 16%) as a yellow solid: m.p. 128.7–129.0°C;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.44 (brs, 1H, NH), 7.56–7.53 (m, 1H, CH), 7.27–7.24 (m, 1H, CH), 7.17–7.09 (m, 3H, 3 CH), 6.92–6.89 (m, 3H, 3 CH), 6.60 (brs, 1H, CH), 6.28–6.27 ppm (m, 1H, CH);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 141.4 (C), 137.9 (C), 133.8 (C), 132.8 (CH), 130.3 (C), 126.6 (CH), 125.2 (CH), 124.9 (CH), 122.4 (CH), 121.2 (CH), 118.7 (CH), 118.3 (CH), 114.9 (CH), 111.4 ppm (CH); IR (neat):  $\tilde{\nu}$  = 3457 (NH), 1640  $\text{cm}^{-1}$  (C=C); MS:  $m/z$  (%): 193 (87) [ $M$ ] $^+$ , 192 (100), 165 (19), 95 (11); elemental analysis calcd (%) for  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}$ : C 87.01, H 5.74, N 7.25; found: C 87.03, H 5.71, N 7.26.

**Synthesis of 2-ethyl-4,4-difluoro-5-indenylidene-1,3,8-trimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (1b):** 2-Acetyl-4-ethyl-3,5-dimethylpyrrole (**2**) (115 mg, 0.7 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (10 mL),  $\text{POCl}_3$  (0.07 mL, 0.8 mmol), pyrrole **3b** (140 mg, 0.7 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (10 mL), triethylamine (0.1 mL, 0.7 mmol) and  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.09 mL, 0.7 mmol) were allowed to react. Flash chromatography using hexane/EtAcO (98:2) afforded **1b** (114 mg, 42%) as a blue solid: m.p. 286–287°C;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.80 (brs, 1H, CH), 7.71–7.68 (m, 1H, CH), 7.21–7.11 (m, 3H, 3 CH), 7.02–6.85 (m, 4H, 4 CH), 2.55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.49 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.36 (q,  $J$  = 7.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.01 ppm (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 160.4 (C=N), 147.3 (C), 141.9 (CH), 141.6 (2 C), 138.0 (C), 137.8 (CH), 136.2 (C), 135.0 (CH), 127.6 (CH), 125.9 (CH), 125.4 (CH), 123.6 (2 C), 121.1 (CH), 120.1 (CH), 119.0 (2 C), 118.4 (CH), 17.1 ( $\text{CH}_2$ ), 16.4 ( $\text{CH}_3$ ), 14.5 ( $\text{CH}_3$ ), 14.0 ( $\text{CH}_3$ ), 13.2 ppm ( $\text{CH}_3$ ); IR (neat):  $\tilde{\nu}$  = 1565 (C=N), 1440  $\text{cm}^{-1}$ ; MS:  $m/z$  (%): 388 (100) [ $M$ ] $^+$ , 373 (59); HR-MS-ESI $^+$ : calcd for ( $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_2 + \text{H}^+$ ): 389.2001; found: 389.1997.

**Synthesis of 2-[1H-fluoren-1-ylidenemethyl]-1H-pyrrole (3c):** Compound **3c** was obtained through two synthetic routes. **Method A:** To a solution of fluorene (1.11 g, 6.7 mmol) in dry THF (40 mL) at 0°C and under an argon atmosphere, was added dropwise a solution of *n*BuLi (1.6 M in hexane) (4.8 mL, 7.6 mmol). The reaction mixture was stirred at RT for 1 h and then, a solution of **11** (1.44 g, 7.4 mmol) in dry THF (20 mL) was added. The mixture was refluxed for 4 h to complete the reaction and allowed to warm at RT before being quenched with saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solu-

tion and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The combined organic phases were washed with  $\text{H}_2\text{O}$ , saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine. The extract was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated to dryness. Flash chromatography using hexane/EtAcO (98:2) afforded **3c** (212 mg, 13%) as a beige solid and **3d** (329 mg, 12%) as a slightly yellow solid.

**Compound 3c:** m.p. 137.6–137.9°C;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.57 (brs, 1H, NH), 8.12 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, CH), 7.72–7.65 (m, 3H, 3 CH), 7.37 (brs, 1H, CH), 7.33–7.19 (m, 4H, 4 CH), 6.92 (brs, 1H, CH), 6.66 (brs, 1H, CH), 6.34–6.32 ppm (m, 1H, CH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 141.2 (C), 140.5 (C), 138.8 (C), 136.8 (C), 132.4 (C), 128.8 (C), 128.5 (CH), 127.8 (CH), 127.3 (CH), 123.5 (CH), 120.8 (CH), 120.7 (CH), 120.4 (CH), 120.1 (CH), 120.0 (CH), 117.3 (CH), 114.3 (CH), 111.1 ppm (CH); IR (neat):  $\tilde{\nu}$  = 3460 (NH), 1580  $\text{cm}^{-1}$  (C=C); MS:  $m/z$  (%): 243 (82) [ $M$ ] $^+$ , 242 (100), 215 (10); elemental analysis calcd (%) for  $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}$ : C 88.86, H 5.39, N 5.76; found: C 88.84, H 5.38, N 5.78.

**Compound 3d:** m.p. 165.0–166.0°C;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.70–7.65 (m, 4H, NH, 3 CH), 7.54–7.52 (m, 2H, 2 CH), 7.34–7.09 (m, 9H, 9 CH), 6.93–6.90 (m, 2H, 2 CH), 6.16–6.14 (m, 1H, CH), 5.70–5.67 (m, 1H, CH), 5.26–5.20 (m, 1H, CH), 4.73 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, 2 CH), 3.29 ppm (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, CH);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 144.6 (2 C), 144.2 (C), 144.0 (C), 141.7 (2 C), 141.2 (2 C), 128.3 (2 CH), 128.0 (2 CH), 127.2 (4 CH), 125.3 (4 CH), 123.3 (C), 120.5 (2 CH), 120.4 (2 CH), 120.3 (CH), 114.1 (CH), 94.9 (CH), 50.0 (2 CH), 48.2 ppm (CH); IR (neat):  $\tilde{\nu}$  = 3457 (NH), 1570  $\text{cm}^{-1}$  (C=C); MS:  $m/z$  (%): 409 (1) [ $M$ ] $^+$ , 244 (100), 165 (19); elemental analysis calcd (%) for  $\text{C}_{31}\text{H}_{23}\text{N}$ : C 90.92, H 5.66, N 3.42; found: C 90.95, H 5.64, N 3.41.

**Method B:** To a stirred suspension of (bromomethyl)triphenylphosphonium bromide (4.46 g, 10.2 mmol) in THF (60 mL) under argon and at –60°C was added sodium bis(hexamethylsilyl)amide (6 mL, 2.0 M in THF). The resulting red solution was stirred at –60°C for 40 min, and then a solution of fluorenone (1.66 g, 9.2 mmol) in THF (10 mL) was added. It was allowed to warm slowly to RT and stirred overnight before being quenched with  $\text{H}_2\text{O}$  and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The extract was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated to dryness. Flash chromatography using hexane afforded **16**<sup>[12]</sup> (2.27 g, 96%) as a yellow solid.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.58 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, CH), 7.72 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, CH), 7.68 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, CH), 7.57 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, CH), 7.45 (dt,  $J$  = 7.7, 1.4 Hz, 1H, CH), 7.40 (s, 1H, CH), 7.39–7.34 (m, 2H), 7.28 ppm (dt,  $J$  = 7.8, 0.8 Hz, 1H, CH).

To a solution of **16** (601 mg, 2.3 mmol) in DME (30 mL) under an argon atmosphere, were added **15** (494 mg, 2.3 mmol) and  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (297 mg, 2.8 mmol) in the presence of a catalytic amount of tetrakis(triphenylphosphine)palladium (8.6 mg, 0.008 mmol). The reaction mixture was refluxed for 38 h to complete the reaction and allowed to warm at RT before being quenched with  $\text{H}_2\text{O}$  and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . The extract was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated to dryness. Flash chromatography using hexane/ $\text{Et}_2\text{O}$  (99:1) afforded **3c** (74 mg, 13%).

**Synthesis of 2-ethyl-4,4-difluoro-5-fluorenylidene-1,3,8-trimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (1c):** 2-Acetyl-4-ethyl-3,5-dimethylpyrrole (**2**) (65 mg, 0.4 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (10 mL),  $\text{POCl}_3$  (0.04 mL, 1.1 mmol), pyrrole **3c** (97 mg, 0.4 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (10 mL), triethylamine (0.06 mL, 0.4 mmol) and  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.05 mL, 0.4 mmol) were allowed to react. Flash chromatography using hexane/EtAcO (98:2) afforded **1c** (26 mg, 15%) as a blue solid: m.p. 277–278°C;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.20 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, CH), 7.87 (brs, 1H, CH), 7.81–7.78 (m, 1H, CH), 7.65–7.58 (m, 2H, 2 CH), 7.26–7.03 (m, 6H, 6 CH), 2.53 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.52 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.35 (q,  $J$  = 7.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.00 ppm (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 160.3 (C=N), 146.4 (C), 141.5 (C), 140.3 (C), 140.0 (C), 138.8 (C), 138.2 (C), 138.0 (C), 136.3 (C), 136.0 (C), 135.5 (C), 134.6 (C), 128.8 (CH), 128.4 (CH), 127.1 (CH), 126.7 (CH), 125.0 (CH), 122.7 (CH), 121.0 (CH), 119.8 (CH), 119.5 (CH), 119.1 (CH), 117.4 (CH), 17.0 ( $\text{CH}_2$ ), 16.3 ( $\text{CH}_3$ ), 14.5 ( $\text{CH}_3$ ), 13.9 ( $\text{CH}_3$ ), 13.1 ppm ( $\text{CH}_3$ ); IR (neat):  $\tilde{\nu}$  = 1568 (C=N), 1447  $\text{cm}^{-1}$  (C=C); MS:  $m/z$  (%): 438 (3) [ $M$ ] $^+$ , 322 (13), 85 (51), 71 (67), 57 (100); HR-MS-ESI $^+$ : calcd for ( $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{BF}_2\text{N}_2 + \text{H}^+$ ): 439.2158; found: 439.2154.

**Synthesis of 2-ethyl-4,4-difluoro-5-(di-9H-fluoren-9-ylmethyl)-1,3,8-trimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (1d):** 2-Acetyl-4-ethyl-3,5-dimethyl-

pyrrole (**2**) (66 mg, 0.4 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (10 mL),  $\text{POCl}_3$  (0.04 mL, 1.1 mmol), pyrrole **3d** (164 mg, 0.4 mmol) in  $\text{CHCl}_3$  (10 mL), triethylamine (0.06 mL, 0.4 mmol) and  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.05 mL, 0.4 mmol) were reacted. Flash chromatography using hexane/EtAcO (98:2) afforded **1d** (100 mg, 40%) as an orange solid: m.p. 318–319°C;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.63–7.60 (m, 4H, 4 CH), 7.36 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, 2 CH), 7.28–7.04 (m, 6H, 7 CH), 7.02–6.99 (m, 2H, 2 CH), 6.76 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, 2 CH), 6.59 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H, CH), 5.40 (t,  $J$  = 4.2 Hz, 1H, CH), 5.14 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 1H, CH), 4.42 (d,  $J$  = 4.2 Hz, 2H, 2 CH), 2.53 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.30 (q,  $J$  = 7.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.18 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.95 ppm (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 157.8 (C=N), 154.5 (C), 145.8 (2 C), 145.3 (4 C), 141.8 (4 C), 141.4 (2 C), 139.1 (C), 127.1 (2 CH), 126.9 (2 CH), 126.6 (2 CH), 126.5 (2 CH), 126.4 (2 CH), 125.9 (2 CH), 119.6 (2 CH), 119.5 (2 CH), 116.5 (CH), 49.7 (2 CH), 44.8 (CH), 17.0 ( $\text{CH}_2$ ), 16.4 ( $\text{CH}_3$ ), 14.6 ( $\text{CH}_3$ ), 13.8 ( $\text{CH}_3$ ), 13.0 ppm ( $\text{CH}_3$ ); IR (neat):  $\tilde{\nu}$  = 1572 (C=N), 1447  $\text{cm}^{-1}$  (C=C); MS:  $m/z$  (%): 439 (52) [ $M$ ] $^+$ –165, 419 (100), 165 (35), 57 (29); HR-MS-ESI $^+$ : calcd for ( $\text{C}_{41}\text{H}_{35}\text{BF}_2\text{N}_2 + \text{H}^+$ ): 605.2940; found: 605.2936.

**X-ray structures:** The structures of the dyes **1b–d** were determined by using single crystal X-ray diffraction. The quality of the data for the dyes **1b** and **1c** are poor, but there were not possible to obtain crystals of better quality. The data collections were realised at low temperature and using Cu radiation to improve the quality of the data.

CCDC 783761 (**1a**), 783762 (**1b**) and 783763 (**1c**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

**Photophysical properties:** The photophysical properties were registered in diluted solutions (around  $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), prepared by adding the corresponding solvent to the residue from the adequate amount of a concentrated stock solution in acetone, after vacuum evaporation of this solvent. UV/Vis absorption and fluorescence spectra were recorded by using a Cary 4E spectrophotometer and a SPEX Fluorolog 3–22 spectrofluorimeter, respectively. Fluorescence quantum yields ( $\phi$ ) were evaluated from corrected spectra by using a diluted methanol solution of the commercial PM567 ( $\phi = 0.91$ )<sup>[32]</sup> and PM650 ( $\phi = 0.06$ )<sup>[33]</sup> as reference, depending of the absorption and emission region of the considered BDP. Radiative decay curves were registered by using the time correlated single-photon counting technique (Edinburgh Instruments, model FL920). Fluorescence emission was monitored at the maximum emission wavelength after excitation at  $\lambda = 470 \text{ nm}$  by means of a diode laser (PicoQuant, model LDH470) with 150 ps FWHM pulses. The fluorescence lifetime ( $\tau$ ) was obtained after the deconvolution of the instrumental response signal from the recorded decay curves by means of an iterative method. The goodness of the exponential fit was controlled by statistical parameters (chi-square, Durbin–Watson and the analysis of the residuals). The rate constant of radiative ( $k_{\text{r}}$ ) and non-radiative ( $k_{\text{nr}}$ ) deactivations were calculated by means of Equation (1).

$$k_{\text{r}} = \phi/\tau \text{ and } k_{\text{nr}} = (1-\phi)/\tau \quad (1)$$

The ground state geometry was optimised by using the B3LYP method and the double valence basis set (6-31G) implemented in the Gaussian 03 software. The energy minimisation process was performed without any geometrical restrictions, and it was considered to be adequately concluded when the analysis of the vibrational frequencies did not give any negative frequency. The absorption properties were simulated by the time-dependent (TD) method together with the above-cited density functional theory (B3LYP).

**Laser experiments:** The commercial laser dyes Coumarin 503 (also called Coumarin 307), Coumarin 522, Coumarin 540 A (also called Coumarin 153) and Pirmomethene 597 (laser grade, Exciton) were used as received with a purity of >99% (checked by spectroscopic and chromatographic methods). Solvents for laser studies were of spectroscopic grade (Merck, Aldrich or Sigma) and were used without purification. The new dyes were incorporated in homopolymers, such as PMMA and PHEMA as well as in linear copolymers obtained by copolymerisation of MMA with different volumetric proportions HEMA. All monomers were purchased

from Aldrich. MMA and the initiator: 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) (Acros) were purified before use while HEMA was used as received.

**Preparation of solid polymeric samples:** The new BDP derivatives were incorporated into the different solid matrices following the procedure previously described.<sup>[34]</sup> The solid monolith laser samples were cast in cylindrical shape, forming rods of 10 mm diameter and 10 mm length. A cut was made parallel to the axis of cylinder to obtain a lateral flat surface of approximately  $6 \times 10 \text{ mm}$ . This surface, as well as the ends of the laser rods, was prepared for lasing experiments by using a grinding and polishing machine (Phoenix Beta 4000, Buehler) until optical-grade finished. The planar grinding stage was carried out by using a Texmet 1000 sand paper (Buehler) with a diamond polishing compound of  $6 \mu\text{m}$  as an abrasive in mineral oil as a lubricant. The final polishing stage was realised with a G-Tuch Microcloth (Buehler), using a cloth disk Mastertex (Buehler) with diamond of  $1 \mu\text{m}$  in mineral oil as an abrasive type.

Liquid solutions of dyes were contained in 1 cm optical-path quartz cells that were carefully sealed to avoid solvent evaporation during experiments. The solutions of the newly synthesised dyes as well as the solid samples doped with these new dyes were transversely pumped at different wavelengths matching the maximum absorption of the corresponding dyes: at  $\lambda = 532 \text{ nm}$ , with 5 mJ per pulse, 6 ns FWHM pulses from a frequency-doubled Q-switched Nd:YAG laser (Monocrom OPL-10) and at  $\lambda = 500, 515$  and  $577 \text{ nm}$ , with 5 mJ, 12 ns FWHM pulses from a Nd:YAG-pumped dye laser (Spectron SL800 with an ethanolic solution of Coumarin 503, Coumarin 522 and Pyrromethene 597, respectively). The exciting pulses were line-focused onto the cell, providing pump fluences on the active medium of  $180 \text{ mJ cm}^{-2}$ . The oscillation cavity (2 cm length) consisted of a 90% reflectivity aluminium mirror, with the lateral face of the cell as output coupler.

The photostability of each dye in liquid phase was also evaluated under experimental conditions identical to those selected to irradiate the fluorophores embedded in solid polymeric matrices, which will allow later comparison of their stability in liquid and solid phases under laser irradiation. Because the irradiated volume in solid samples was estimated to be  $10 \mu\text{L}$ , capillary tubes into which ethyl acetate solutions of dyes were incorporated offer the best geometry to reproduce the volume irradiated in the solid samples, thus maintaining the same laser pump conditions in both cases. Although the low optical quality of the capillary prevents laser emission from the dyes, information about photostabilities can be obtained by monitoring the decrease in laser-induced fluorescence intensity, excited transversally to the capillary, as a function of the number of pump pulses at 10 Hz repetition rate. The fluorescence emission was monitored perpendicular to the exciting beam, and its collection and analysis was carried out with the same set-up selected to characterise the laser emission from dyes incorporated into solid samples.

## Acknowledgements

This work was supported by Projects MAT2007-65778-C02-01, MAT2007-65778-C02-02, CTQ2008-02820, TRACE2009-0144 and MAT2010-20646-C04-02 of the Spanish MICINN, and GR58/08 of the UCM/BSCH. M. E. Perez-Ojeda thanks CSIC for her JAE predoctoral contract. The SGI/IZO-SGIker UPV/EHU is gratefully thanked for allocation of computational resources. We acknowledge support provided by the Centro de Resonancia Magnética de la Universidad Complutense de Madrid.

- [1] a) A. Costela, I. García-Moreno, R. Sastre in *Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices*, Vol. 7 (Ed.: H. S. Nalwa), Academic, San Diego, **2001**, Chapter 4, p. 161; b) A. Costela, I. García-Moreno, R. Sastre, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 4745–4763; c) J. Bañuelos Prieto, F. López Arbeloa, V. Martínez Martínez, T. López Arbeloa, I. López Arbeloa, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 5503–5508; d) F. López Arbeloa, J. Bañuelos, V. Martínez, T. Arbeloa, I. López Arbeloa, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2005**, *24*,

- 339–374; e) A. Costela, I. García-Moreno, C. Gómez, O. García, R. Sastre, A. Roig, E. Molins, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4475–4480; f) O. García, R. Sastre, D. del Agua, A. Costela, I. García-Moreno, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 601–602; g) M. Álvarez, A. Costela, I. García-Moreno, F. Amat-Guerri, M. Liras, R. Sastre, F. López Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, I. López Arbeloa, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 802–813.
- [2] S. C. Guggenheimer, J. H. Boyer, K. Thangaraj, M. Shah, M.-L. Soong, T. G. Pavlopoulos, *Appl. Opt.* **1993**, *32*, 3942–3943.
- [3] a) T. G. Pavlopoulos, J. H. Boyer, M. Shah, K. Thangaraj, M.-L. Soong, *Appl. Opt.* **1990**, *29*, 3885–3889; b) G. H. Jones, S. Kumar, O. Klueva, D. Pacheco, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 8429–8434; c) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932; d) S. Mula, A. K. Ray, M. Banerjee, T. Chaudhuri, K. Dasgupta, S. Chattopadhyay, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2146–2154; e) A. Costela, I. García-Moreno, M. Pintado-Sierra, F. Amat-Guerri, M. Liras, R. Sastre, F. López Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, I. López Arbeloa, *J. Photochem. Photobiol. A* **2008**, *198*, 192–199; f) G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1202–1219; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184–1201.
- [4] T. Kowada, S. Yamaguchi, K. Ohe, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 296–298.
- [5] a) A. Nagai, J. Miyake, K. Kokado, Y. Nagata, Y. Chujo, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15276–15278; b) G. Meng, S. Velayudham, A. Smith, R. Luck, H. Liu, *Macromolecules* **2009**, *42*, 1995–2001; c) V. R. Donuru, G. K. Vegesna, S. Velayudham, S. Green, H. Liu, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2130–2138.
- [6] a) C. Goze, G. Ulrich, R. Ziessel, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 313–322; b) S. Goeb, R. Ziessel, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2569–2574; c) A. Harriman, L. J. Mallon, S. Goeb, G. Ulrich, R. Ziessel, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 4553–4564; d) T. Bura, R. Ziessel, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2875–2879.
- [7] D. Armesto, M. G. Gallego, W. M. Horspool, A. R. Agarrabeitia, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9223–9240.
- [8] G. G. Kleinspehn, A. H. Corwin, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1048–1050.
- [9] N. Ono, T. Yamamoto, N. Shimada, K. Kuroki, M. Wada, R. Utsunomiya, T. Yano, H. Uno, T. Murashima, *Heterocycles* **2003**, *61*, 433–447.
- [10] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers in *Organic Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **2001**, p. 1159.
- [11] D.-C. Wang, H.-P. Wang, S. Gao, T.-Y. Zhang, X.-J. Peng, *Acta Crystallogr. Sect. E* **2007**, *63*, o2238–o2239.
- [12] G. C. Paul, J. J. Gajewski, *Synthesis* **1997**, 524–526.
- [13] a) A. Burghart, H. Kim, M. B. Welch, L. H. Thoresen, J. R. Reibenspies, K. Burgess, F. Bergström, L. B.-A. Johansson, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7813–7819; b) J. Chen, A. Burghart, A. Derecskei-Kovacs, K. Burgess, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2900–2906.
- [14] a) Q. Zheng, G. Xu, P. N. Prasad, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5812–5819; b) S. Mula, A. K. Ray, M. Banerjee, T. Chaudhuri, K. Dasgupta, S. Chattopadhyay, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2146–2154; c) T. T. Vu, S. Badré, C. Dumas-Verdes, J.-J. Vachon, C. Julien, P. Audebert, E. Y. Senotrusova, E. Y. Schmidt, B. A. Trofimov, R. B. Pansu, G. Clavier, R. Méallet-Renault, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 11844–11855.
- [15] S. A. Pérez Guarín, S. Dufresne, D. Tsang, A. Sylla, W. G. Skene, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2801–2811.
- [16] a) R. K. Lammi, A. Ambroise, T. Balasubramanian, R. W. Wagner, D. F. Bocian, D. Holtan, J. S. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7579–7591; b) R. K. Lammi, R. W. Wagner, A. Ambroise, J. R. Diers, D. F. Bocian, D. Holtan, J. S. Lindsey, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5341–5352; c) C.-W. Wan, A. Burghart, J. Chen, F. Bergström, L. B.-A. Johansson, M. F. Wolford, T. G. Kim, M. R. Topp, R. M. Hochtrasser, K. Burgess, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430–4441; d) D. Kumaresan, A. Datta, M. Ravikanth, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *395*, 87–91; e) R. Ziessel, C. Goze, G. Ulrich, M. Césario, P. Retailleau, A. Harriman, J. P. Rostron, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7366–7378.
- [17] S. Speiser, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1953–1976.
- [18] a) G. D. Scholes, K. P. Ghiggino, A. M. Oliver, M. N. Paddon-Row, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4345–4349; b) K. P. Ghiggino, E. K. L. Yeow, D. J. Haines, G. D. Scholes, T. A. Smith, *J. Photochem. Photobiol. A* **1996**, *102*, 81–86.
- [19] J. Bañuelos, F. López Arbeloa, T. Arbeloa, S. Salleres, F. Amat-Guerri, M. Liras, I. López Arbeloa, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 10816–10822.
- [20] J. R. Lakowicz in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, **2006**.
- [21] a) C. Reichardt, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319–2358; b) A. R. Katritzky, D. C. Fara, H. Yang, K. Tamm, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 175–198.
- [22] a) M. J. Kamlet, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 377–383; b) M. J. Kamlet, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2886–2894; c) M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6027–6038.
- [23] J. Catalan, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5951–5960.
- [24] T. G. Pavlopoulos, *Prog. Quantum Electron.* **2002**, *26*, 193–224.
- [25] T. Waugh, H. Morrison, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3083–3092.
- [26] M. J. Bearpark, F. Bernardi, M. Olivucci, M. A. Robb, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 8395–8401.
- [27] a) A. Togni, T. Hayashi, *Ferrocene*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**; b) B. R. Waldbaum, R. C. Kerber, *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *291*, 109–126.
- [28] a) K. Rurack, M. Kollmannsberger, U. Resch-Genger, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 968–969; b) R. Méallet-Renault, R. Pansu, S. Amigoni-Gerbier, C. Larpent, *Chem. Commun.* **2004**, 2344–2345; c) K. Yamada, Y. Nomura, D. Citterio, N. Iwasawa, K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6956–6957; d) J. L. Bricks, A. Kovalchuk, C. Trieflinger, M. Nofz, M. Büschel, A. I. Tolmachev, J. Daub, K. Rurack, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13522–13529; e) T. Kálai, K. Hideg, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 10352–10360.
- [29] F. Wilkinson, D. J. McGarvey, A. F. Olea, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 3762–3769.
- [30] A. Costela, I. García-Moreno, J. M. Figuera, F. Amat-Guerri, R. Mallavia, M. D. Santa María, R. Sastre, *J. Appl. Phys.* **1996**, *80*, 3167–3173.
- [31] N. N. Barashkov, O. A. Gonder, *Fluorescence Polymers*, Ellis Horwood, Chichester, **1994**.
- [32] F. López Arbeloa, T. López Arbeloa, I. López Arbeloa, I. García-Moreno, A. Costela, R. Sastre, F. Amat-Guerri, *Chem. Phys.* **1998**, *236*, 331–341.
- [33] F. López Arbeloa, J. Bañuelos, V. Martínez, T. Arbeloa, I. López Arbeloa, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1762–1771.
- [34] M. Álvarez, F. Amat-Guerri, A. Costela, I. García-Moreno, C. Gómez, M. Liras, R. Sastre, *Appl. Phys. B* **2005**, *80*, 993–1006.

Received: July 22, 2010

Published online: October 19, 2010





Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 13026–13033

www.rsc.org/pccp

# Development of excellent long-wavelength BODIPY laser dyes with a strategy that combines extending $\pi$ -conjugation and tuning ICT effect†

Dakui Zhang,<sup>a</sup> Virginia Martín,<sup>\*b</sup> Inmaculada García-Moreno,<sup>b</sup> Angel Costela,<sup>b</sup> M. Eugenia Pérez-Ojeda<sup>b</sup> and Yi Xiao<sup>\*a</sup>

Received 4th April 2011, Accepted 31st May 2011

DOI: 10.1039/c1cp21038f

By comparison and combination of two strategies, extending  $\pi$ -conjugation and tuning Intramolecular Charge Transfer (ICT) effect, new long-wavelength BODIPY dyes have been efficiently synthesized. The new chromophores exhibit good optical properties: high fluorescence quantum yields, exceptionally large molar extinction coefficients, narrow red-emission bands, and relatively large Stokes shifts *etc.*, in polar or apolar solvents. Besides, the new dyes, under transversal pumping at 532 nm, exhibit highly efficient and stable laser emission tunable from the green to NIR spectral region (570–725 nm). Moreover, one of these new BODIPY derivatives shows cell membrane permeability and bright intracellular red fluorescence. These advantageous characteristics assure the potential of these dyes for biophotonic applications.

## 1. Introduction

In the biophotonics related fields, long wavelength (> 600 nm) fluorescent dyes have clear advantages over shorter wavelength ones because long wavelength light can penetrate deeper into tissues.<sup>1</sup> On one hand, for *in vivo* imaging, the long wavelength probe's fluorescence does not interfere with biological background fluorescence which is in the shorter wavelength region. On the other hand, for dye lasers increasingly applied in surgical treatment and photodynamic therapy (PDT), long wavelength lasers favour the photodamage of deep lesions while short wavelength lasers can only treat lesions on the surface.<sup>2</sup> Although long wavelength fluorescent dyes are in great demand, so far, there are only a few with satisfactory properties suitable for extensive applications. Most usual dyes exhibit drawbacks such as relatively low fluorescence quantum yields, poor photostability, difficulty in synthesis and derivatization, and/or poor biological compatibility.

Many research groups,<sup>3</sup> including ours,<sup>4</sup> are continuously searching for appropriate long wavelength fluorescent dyes by developing some novel fluorophores and modifying the structures of some conventional ones. Among the important fluorophores, BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene) dyes are most popular, because many members in this family

show excellent optical properties such as high fluorescence quantum yields, large molar extinction coefficients, narrow emission bands, and excellent photostabilities. Moreover, their optical properties are insensitive to environmental factors such as polarity and pH.<sup>5</sup> However, typical BODIPYs emit at the green-yellow spectral region, not ideal for some sophisticated applications in optoelectronics and biophotonics. Thus, much attention has been paid to the incorporation of proper chemical modifications on the BODIPY core in order to achieve red-spectral shifts.

To this end, two strategies can be followed: extending  $\pi$ -conjugations<sup>6</sup> and forming ICT (Intramolecular Charge Transfer) structures.<sup>7</sup> The former usually results in longer wavelength derivatives that inherit the excellent optical properties from the BODIPY precursors, but in many cases it requires superb synthetic skills; for example, several researches have fused aromatic or heterocyclic rings to the BODIPY core *via* relatively long synthetic routes.<sup>6c,d</sup> The ICT strategy is very effective in producing redshifts, and is relatively easy to realize in synthesis. However, the up to now reported BODIPY derivatives of strong ICT character lose some of the typical characteristics of the family. Thus, in highly polar media, significant decrease in fluorescence intensity and broadening in fluorescence spectra are observed.<sup>7a,8</sup> Although this is a good design feature for development of sensors,<sup>9</sup> it might not be suitable for many other biological applications. On the other hand, we know based on our experience<sup>4a</sup> that a few other ICT fluorophores show strong and narrow-band fluorescence regardless of polarity (although the cases are not common). So there remains room for development of such special ICT BODIPY derivatives.

In this work, through comparison and combination of the above two strategies, we developed new red-emitting derivatives, under the precondition of maintaining the excellent optical

<sup>a</sup> State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Linggong Road 2, 116024 Dalian, China.

E-mail: xiaoyi@dlut.edu.cn; Fax: +86 411 84986252

<sup>b</sup> Instituto de Química-Física "Rocasolano", CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain. E-mail: vmartin@iqfr.csic.es; Fax: +34 915 642 431; Tel: +34 917 459 532

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthesis details, diagrams of MOs levels, and <sup>1</sup>H-RMN and <sup>13</sup>C-RMN spectra. See DOI: 10.1039/c1cp21038f



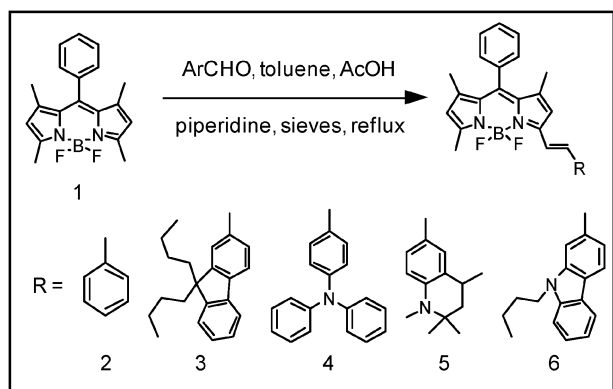


Fig. 1 Synthetic route to obtain BODIPY derivatives 2–6.

properties of the BODIPY family. As shown in Fig. 1, we synthesized a series of compounds by Knoevenagel condensation of the BODIPY core and aromatic aldehydes, since this method is one of the most efficient and facile protocols for extending conjugation on the BODIPY platform. Compound **2** was synthesized for being used as reference to assess the effect on their optical properties and laser behaviour of incorporating different electron-donating groups. The new dyes exhibit efficient and stable laser emission tunable from the green to NIR spectral region (565–720 nm). Finally, one-photon cellular imaging of cancer cells was demonstrated with the aid of one newly synthesized BODIPY.

## 2. Experimental part

### 2.1 Materials

Benzaldehyde was obtained from commercial sources and used without further purification and other aldehydes were synthesized according to standard procedures. Toluene was dried over suitable reagents and distilled under argon immediately prior to use. The commercial laser dyes Pyrromethene 567 and Pyrromethene 597 (laser grade, Exciton) were used as received with a purity > 99% (checked by spectroscopic and chromatographic methods). Solvents for laser studies were of spectroscopic grade (Merck, Aldrich or Sigma) and were used without purification.

### 2.2 General methods

The 400 ( $^1\text{H}$ ) MHz NMR and 100 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz NMR spectra were registered at room temperature on a Bruker 400 MHz spectrometer using perdeuterated solvents as internal standard:  $\delta$  (H) in ppm relative to a residual protiated solvent;  $\delta$  (C) in ppm relative to the solvent. Melting points were obtained with a capillary melting point apparatus in open-ended capillaries and are uncorrected. Chromatographic purification was conducted with silica gel. All solvent mixtures are given as volume/volume ratios. Absorption spectra were recorded in THF on a US-HP8453 UV-Visible absorption spectrometer and emission spectra were recorded by using a PTI-700 instrument. All studies were made at 20 °C. Excitation and emission spectra were fully corrected by reference to a standard lamp. Solutions were deoxygenated by purging with dried argon

prior to recording the spectrum. The reference system used was Rhodamine B in methanol ( $\phi_r = 0.69$ ).

**2.2.1 Quantum-chemical calculation details.** All calculations were performed with the Gaussian 03 package for Computational Chemistry, CAS at the B3LYP level. The basis set 6-31G was used for the calculation of HOMO and LUMO levels. The contour plots of MOs were obtained with the GaussView 3.07 program.

**2.2.2 Cyclic voltammetry.** Electrochemical studies made use of cyclic voltammetry with a conventional 3-electrode system using a BAS 100 W electrochemical analyzer in deoxygenated and anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  at room temperature. The potentials are reported vs. ferrocene as internal standard and potentials are calculated relative to SCE assuming  $E_{1/2}(\text{Fc}/\text{Fc}^+) = +0.38 \text{ V}$  ( $\Delta E_p = 70 \text{ mV}$ ) vs. SCE using a scan rate of  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , a glassy carbon working electrode,  $\text{Ag}/\text{AgNO}_3$  reference electrode, platinum counter electrode, and the sample solutions containing  $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$  sample and  $0.1 \text{ M}$  tetrabutylammonium hexafluorophosphate as a supporting electrolyte. Argon was bubbled for 10 min before each measurement.

**2.2.3 Laser experiments.** Unremoved air liquid solutions of dyes were contained in 1 cm optical-path quartz cells that were carefully sealed to avoid solvent evaporation during experiments. The solutions of the newly synthesized dyes were transversely pumped at different wavelengths matching the maximum absorption of the corresponding dyes: at 532 nm, with 5 mJ per pulse, 6 ns FWHM pulses from a frequency-doubled Q-switched Nd:YAG laser (Monocrom OPL-10) as well as at 570 and 590 nm, with 5 mJ, 12 ns FWHM pulses from a Nd:YAG-pumped dye laser (Spectron SL800 with ethanolic solutions of Pyrromethene 567 and Pyrromethene 597, respectively). The exciting pulses were line-focused onto the cell, providing pump fluence on the active medium of  $180 \text{ mJ cm}^{-2}$ . The oscillation cavity (2 cm length) consisted of a 90% reflectivity aluminium mirror, with the lateral face of the cell as an output coupler.

The photostability of the dyes was evaluated by irradiating under lasing conditions 10  $\mu\text{L}$  of a solution in ethyl acetate. The solutions were contained in a cylindrical Pyrex tube (1 cm height, 1 mm internal diameter) carefully sealed to avoid solvent evaporation during the experiments. Although the low optical quality of the capillary prevents laser emission from the dyes, information about photostabilities can be obtained by monitoring the decrease in laser-induced fluorescence intensity, excited transversally to the capillary, as a function of the number of pump pulses at 10 Hz repetition rate. The fluorescence emission was monitored perpendicular to the exciting beam, collected by an optical fiber, and imaged onto the input slit of a monochromator (Acton Research corporation) and detected with a charge-coupled device (CCD) (SpectruMM:GS128B). The fluorescence emission was recorded by feeding the signal to the boxcar (Stanford Research, model 250) to be integrated before being digitized and processed by a computer. Each experience was repeated at least three times. The estimated error in the energy and photostability measurements was 10%.

## 2.2.4 General procedure for the synthesis of new BODIPYs.

Compound **1** (200 mg, 0.617 mmol) and aromatic aldehyde (0.617 mmol) were refluxed in a mixture of toluene (20 mL), glacial acetic acid (0.35 mL), and piperidine (0.46 mL). Any water formed during the reaction was removed azeotropically by heating overnight in a Dean–Stark apparatus. Crude product was then concentrated under vacuum, and purified by silica gel column chromatography.

(*E*)-3-(*1,5,7-trimethyl-8-phenyl-4,4-difluoroboradiazaindacene* (**2**)). **1** (200 mg, 0.617 mmol) and benzaldehyde (0.065 g, 0.617 mmol) were reacted according to the general process, and purified by silica gel column chromatography (EtOAc–hexane 1:4). The pink colored fraction was collected and the solvent was removed under reduced pressure to yield the bright yellow fluorescent compound **2** (64 mg, 25% yield). Mp 220.0–222.0 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.0 (s, 1H, Ar–H), 6.7 (s, 1H, Ar–H), 7.15–7.20 (m, 4H, ArH), 7.24 (s, 1H, –CH=CHPh), 7.42–7.48 (m, 6H, ArH), 7.62 (s, 1H, –CHPh=CH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 153.4, 153.1, 143.6, 143.2, 140.5, 140.2, 139.4, 139.2, 138.0, 137.8, 135.0, 134.4, 133.7, 129.3, 129.0, 128.1, 126.5, 121.9, 121.1, 17.4, 15.2, 14.8. TOF MS EI<sup>+</sup> calc. for C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub> 412.1922, found 412.1920.

(*E*)-3-(*9,9-Dibutyl-2-vinyl-9H-fluorene*)-1,5,7-trimethyl-8-phenyl-4,4-difluoroboradiazaindacene (**3**). **1** (200 mg, 0.617 mmol) and 9,9-dibutyl-9H-fluorene-2-carbaldehyde (0.189 g, 0.617 mmol) were refluxed in a mixture of toluene (20 mL), glacial acetic acid (0.35 mL), and piperidine (0.46 mL). It was purified by silica gel column chromatography (EtOAc–hexane 1:4). The pink colored fraction was collected and the solvent was removed under reduced pressure to yield the bright orange-yellow fluorescent compound **3** (52 mg, 28% yield). Mp 238.0–239.0 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.51–0.62 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 0.67 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.02–1.10 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.88–2.00 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.0 (s, 1H, ArH), 6.8 (s, 1H, ArH), 7.15–7.20 (m, 5H, ArH), 7.06 (br, 2H, –CH=CHPh), 7.31–7.33 (m, 3H, ArH), 7.42–7.45 (m, 2H, ArH), 7.50–7.55 (m, 1H, ArH), 7.64–7.66 (m, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 154.1, 153.7, 152.2, 144.2, 144.1, 144.0, 142.7, 139.8, 138.4, 138.0, 135.6, 134.7, 133.2, 131.2, 130.0, 129.9, 129.2, 129.1, 128.4, 128.2, 127.9, 126.7, 125.1, 124.6, 123.1, 121.2, 120.1, 56.0, 41.5, 26.0, 23.3, 18.6, 15.4, 14.9, 14.1. TOF MS EI<sup>+</sup> calc. for C<sub>41</sub>H<sub>43</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>2</sub> 612.3487, found 612.3480.

(*E*)-3-(*4-N,N-Diphenyl-styryl*)-1,5,7-trimethyl-8-phenyl-4,4-difluoroboradiazaindacene (**4**). **1** (200 mg, 0.617 mmol) and 4-(diphenylamino)benzaldehyde (0.168 g, 0.617 mmol) were refluxed in a mixture of toluene (20 mL), glacial acetic acid (0.35 mL), and piperidine (0.46 mL). Any water formed during the reaction was removed azeotropically by heating overnight in a Dean–Stark apparatus. Crude product was then concentrated under vacuum, and purified by silica gel column chromatography (EtOAc–hexane 1:7). The blue colored fraction was collected and the solvent was removed under reduced pressure to yield the red fluorescent compound **4** (128 mg, 36% yield). Mp 226.0–227.0 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.12

(s, 1H, ArH), 6.76 (s, 1H, ArH), 7.15–7.20 (m, 8H, ArH), 7.24–7.32 (m, 6H, ArH), 7.36–7.60 (m, 7H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 154.4, 152.2, 147.7, 147.3, 144.6, 144.2, 142.7, 142.5, 141.2, 140.6, 140.2, 139.8, 137.6, 137.2, 135.2, 134.5, 133.2, 130.2, 128.4, 127.4, 126.1, 121.9, 121.0, 19.3, 15.9, 15.2. TOF MS EI<sup>+</sup> calc. for C<sub>38</sub>H<sub>32</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub> 579.2657, found 579.2660.

(*E*)-3-(*1,2,2,4-Tetramethyl-6-vinyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline*)-1,5,7-trimethyl-8-phenyl-4,4-difluoroboradiazaindacene (**5**). **1** (200 mg, 0.617 mmol) and 1,2,2,4-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-6-carbaldehyde (0.134 g, 0.617 mmol) were refluxed in a mixture of toluene (20 mL), glacial acetic acid (0.35 mL), and piperidine (0.46 mL). Crude product was then concentrated under vacuum, and purified by silica gel column chromatography (EtOAc–hexane 1:7). The blue colored fraction was collected and the solvent was removed under reduced pressure to yield the red fluorescent compound **5** (68 mg, 21% yield). Mp 268.6–269.9 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.56 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.70 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.30–2.34 (m, 5H), 2.88 (m, 1H, CH), 3.54 (s, 3H, N–CH<sub>3</sub>), 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.10 (s, 1H, ArH), 6.82 (s, 1H, ArH), 7.00 (br, 2H, –CH=CHPh), 7.15–7.20 (m, 5H, ArH), 7.25–7.31 (m, 3H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 154.2, 148.9, 148.7, 144.6, 144.5, 143.2, 143.0, 142.8, 139.8, 139.4, 138.8, 138.4, 136.0, 135.4, 134.5, 134.0, 133.8, 133.2, 128.7, 126.8, 122.6, 60.2, 57.2, 42.0, 38.8, 35.3, 32.2, 20.8, 16.4, 15.6. TOF MS EI<sup>+</sup> calc. for C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub> 523.2970, found 523.2963.

(*E*)-3-(*9-Butyl-3-vinyl-9H-carbazole*)-1,5,7-trimethyl-8-phenyl-4,4-difluoroboradiazaindacene (**6**). **1** (200 mg, 0.617 mmol) and 3-carbaldehyde (0.155 g, 0.617 mmol) were refluxed in a mixture of toluene (20 mL), glacial acetic acid (0.35 mL), and piperidine (0.46 mL). Any water formed during the reaction was removed azeotropically by heating overnight in a Dean–Stark apparatus. Crude product was then concentrated under vacuum, and purified by silica gel column chromatography (EtOAc–hexane 1:15). The blue colored fraction was collected and the solvent was removed under reduced pressure to yield the bright red fluorescent compound **6** (130 mg, 38% yield). Mp 168.3–169.7 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.76 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.04 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.32 (t, 2H, N–CH<sub>2</sub>), 6.14 (s, 1H, ArH), 6.78 (s, 1H, ArH), 7.05 (br, 2H, –CH=CHPh), 7.12–7.20 (m, 4H, ArH), 7.28–7.32 (m, 4H, ArH), 7.36–7.42 (m, 4H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 155.2, 146.8, 146.2, 145.2, 145.0, 144.8, 144.0, 143.7, 143.2, 142.6, 141.6, 141.3, 140.9, 140.7, 140.1, 138.8, 138.2, 136.2, 135.0, 133.2, 130.1, 129.1, 128.7, 126.5, 121.3, 120.0, 65.1, 36.2, 32.5, 20.4, 19.8, 16.7, 15.3. TOF MS EI<sup>+</sup> calc. for C<sub>36</sub>H<sub>34</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub> 557.2814, found 557.2810.

## 3. Results and discussion

The routes followed to synthesize these new dyes are detailed in the Experimental section and the ESI.†

### 3.1 Optical properties

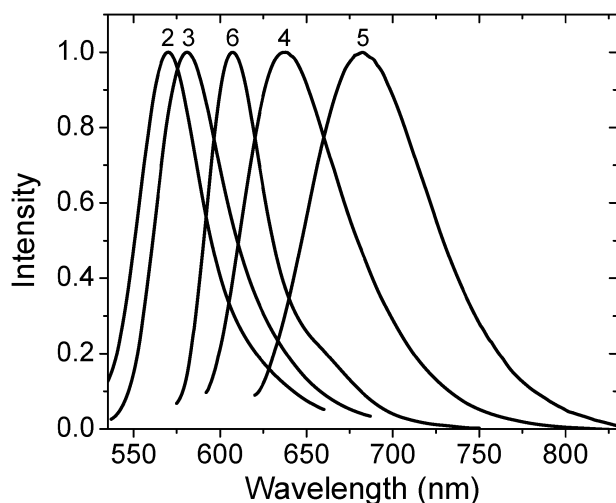
The photophysical properties of dyes **2–6** in different solvents are compiled in Table 1 and Fig. 2. Compound **2**, which has

**Table 1** Optical properties of compounds **2–6** in liquid solutions<sup>a</sup>

Hexane						Acetonitrile						Ethanol					
$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{flu}}/\text{nm}$	$\Delta S^b/\text{cm}^{-1}$	FWHM <sup>c</sup> /nm	$\phi_f$	$\epsilon \times 10^5 (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{flu}}/\text{nm}$	$\Delta S^b/\text{cm}^{-1}$	FWHM <sup>c</sup> /nm	$\phi_f$	$\epsilon \times 10^5 (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{flu}}/\text{nm}$	$\Delta S^b/\text{cm}^{-1}$	FWHM <sup>c</sup> /nm	$\phi_f$	$\epsilon \times 10^5 (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$
<b>2</b> 561	570	281	46	0.73	0.72	560	569	282	45	0.70	0.71	562	571	280	46	0.70	0.73
<b>3</b> 571	583	360	43	0.71	0.85	572	583	330	41	0.68	0.92	573	585	358	43	0.68	0.81
<b>4</b> 591	607	446	62	0.59	0.63	587	678	2287	75	0.03	0.65	589	644	1450	78	0.15	0.54
<b>5</b> 607	624	449	78	0.48	1.40	612	725	2548	105	0.08	1.01	612	695	1951	100	0.04	1.13
<b>6</b> 582	600	515	45	0.67	1.57	582	612	842	44	0.63	1.31	584	611	757	43	0.64	1.22

<sup>a</sup> The reference system used was Rhodamine B in methanol ( $\phi_f = 0.69$ ). <sup>b</sup> Stokes shift calculated from the absorption and emission energies.

<sup>c</sup> FWHM = Full-Width at Half Maximum (emission spectra).

**Fig. 2** Normalized emission spectra of compounds **2–6** in ethanol.

the smallest conjugation size and lacks any electron-donating groups, absorbs and emits at much longer wavelengths ( $\Delta\lambda > 60$  nm) than parent compound **1** ( $\lambda = 498$  nm,  $\lambda_{\text{flu}} = 508$  nm),<sup>5b</sup> as a consequence of the extending conjugated system.

By changing the benzene unit of compound **2** to fluorene, we got compound **3** with considerably larger conjugation. However, such a change resulted in red-shifts of absorption and emission by only 10–14 nm, indicating that further extending the  $\pi$ -conjugation affects wavelengths only slightly. Next, we modified the benzene unit by introducing electron-donating groups to get compounds **4** and **5**. The structures of these compounds are different from that of the known ICT BODIPY derivatives which have dialkylphenylamino type electron donors. We consider that high ICT strength and movement of the flexible bonds in excited state are important factors leading to fluorescence quenching. Thus, in compound **4** the triphenyl-amino group, which has relatively weak electron-donating ability, helps lower the ICT strength; and in compound **5** the amino group is rigidified in a cyclic tetrahydro-quinoline framework, which inhibits the rotation of the C–N bond. As it was expected, the optical properties of dyes **2** and **3** with only extended conjugation are not dependent on the solvent. However, unfortunately, compounds **4** and **5** still show pronounced sensitivity to solvent polarity, similar to the ICT BODIPY compounds referred in the literature.<sup>7a</sup> They have much lower fluorescence quantum yields ( $\phi_f$ ) and broader emission bands

in highly polar solvents than compounds **2** and **3**, although their merits of exhibiting considerably longer wavelength emissions and larger Stokes shifts are quite valuable. This behaviour is explained taking into account that apolar solvents avoid, to some extent, the intramolecular charge transfer and fluorescence emission occurs from the locally excited state, while in polar media the ICT states are further stabilized leading to a broadening in the emission bands and a drastic decrease in the corresponding fluorescence quantum yields.

Finally, we turned to compound **6**, with a carbazole unit, acting as the electron donor, to extend conjugation. Because the carbazole group has good planarity and aromaticity, compound **6** has a conjugation system larger than that of compound **2** and close to that of compound **3**. Its ICT strength is further lowered in comparison with compound **4**, since the planarity of carbazole favours the delocalization of the lone pair electron of the nitrogen atom, which leads to the decrease in the electron-push effect. In addition, the rigidity of the electron donor group in compound **6** is similar to or even stronger than that of the corresponding tetrahydro-quinoline moiety in compound **5**. As expected, compound **6** shows satisfactory optical properties: it emits in the red-light range (e.g.  $\lambda_{\text{flu}} = 611$  nm, in ethanol). In different solvents, the fluorescence quantum yields are similarly high ( $\phi_f = 0.63$ – $0.67$ ), and the emission bands are very narrow with small full-width at half maximum (FWHM) values (around 44 nm), which are similar to those of compounds **2** and **3**. However, its absorption and emission maxima are indeed red-shifted, as compared with compounds **2** and **3** (40 and 26 nm in ethanol, respectively).

The Stokes shifts of compound **6** are around 20–30 nm, which are considerably larger than those of compound **2** ( $\sim 9$  nm) and **3** ( $\sim 12$  nm). Furthermore, compound **6** has very large molar extinction coefficients, of up to  $1.22$ – $1.57 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , much larger than those of compounds **2–4**, which is also an important advantage. In short, long-wavelength compound **6** inherits the good properties from the BODIPY family, showing simultaneously certain characteristics of an ICT fluorophore, due to the combined effects brought by the carbazole group.

In order to get deeper understanding, the electron states of compound **2–6** are investigated through cyclic voltammetry and theoretical calculation (B3LYP, 6-31G, details in ESI†), with results summarized in Table 2.

The theoretical calculation data reveal evident ICT processes in compounds **4–6**: the electrons distribute on the whole conjugated range on the HOMO energy level and then transfer



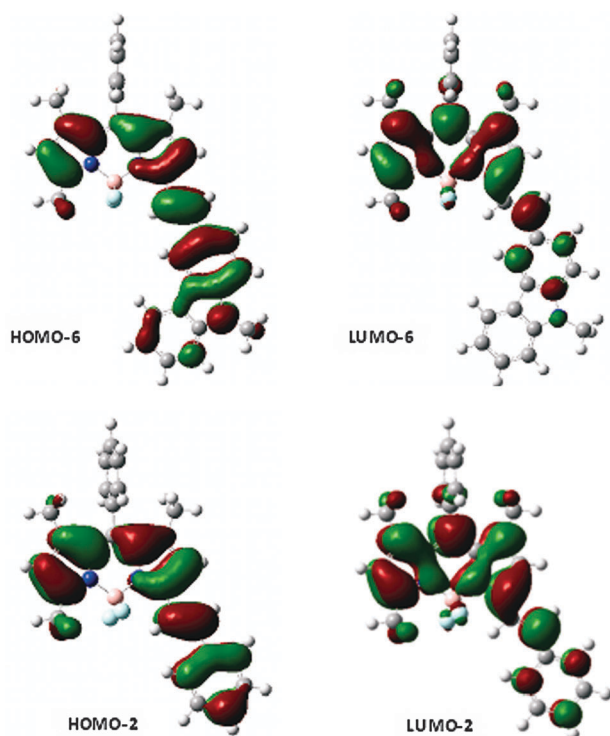
**Table 2** Electron states studies of compounds 2–6

	$E_g^a$ /eV	$E_{\text{onset}}^{\text{ox}b}$ /eV	$E_p^{\text{ox}c}$ /eV	HOMO/ LUMO <sup>d</sup> (eV)	HOMO/ LUMO <sup>e</sup> (eV)
<b>2</b>	2.20	0.92	1.01	−5.32/−3.12	−5.14/−2.61
<b>3</b>	2.17	0.81	0.94	−5.21/−3.04	−5.00/−2.58
<b>4</b>	2.11	0.54	0.70	−4.94/−2.83	−4.73/−2.91
<b>5</b>	2.04	0.34	0.52	−4.74/−2.70	−4.54/−2.31
<b>6</b>	2.12	0.63	0.78	−5.03/−2.91	−4.84/−2.45

<sup>a</sup> Energy band gap, determined from UV-Vis absorption maximum.

<sup>b</sup>  $E_{\text{onset}}^{\text{ox}}$  = onset oxidation potential. <sup>c</sup>  $E_p^{\text{ox}}$  = oxidation peak potential; potentials reported vs. ferrocene as internal standard, glassy carbon working electrode, Ag/AgNO<sub>3</sub> reference electrode, platinum counter electrode, 0.1 M Bu<sub>4</sub>NPF<sub>6</sub>–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, scan rate 100 mV s<sup>−1</sup> at 20 °C.

<sup>d</sup> HOMO =  $E_{\text{onset}}^{\text{ox}}$  + 4.4 eV; LUMO = HOMO −  $E_g$  eV. <sup>e</sup> Energy levels estimated from theoretical calculation.

**Fig. 3** Electronic density of the HOMO and LUMO states of (a) compound 6 and (b) compound 2.

to the BODIPY core from the electron donors on the LUMO energy level (Fig. 3a). In compounds 2 and 3, there are no ICT effects, although the electron delocalizes on the conjugated system (Fig. 3b). In agreement with theoretical calculation, cyclic voltammetry studies show again similar results for compounds 4–6, in which the presence of electron donating groups determines higher HOMO levels than those of compounds 2–3. The analysis of the oxidation potentials defines the carbazole group as a weaker donor than the triphenylamine and tetrahydro-quinoline groups, and consequently, the HOMO level of compound 6 is actually located at a lower energy than those of compounds 4 and 5.

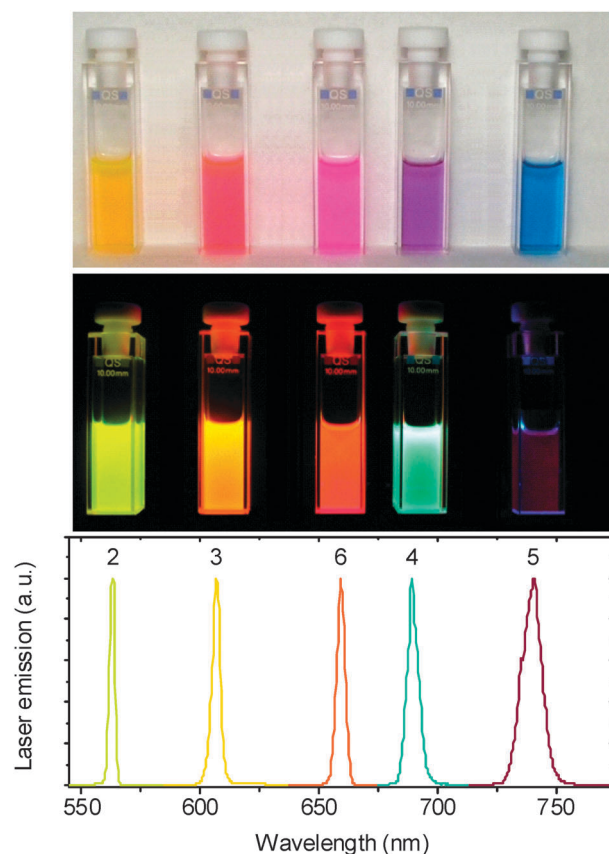
### 3.2 Lasing properties

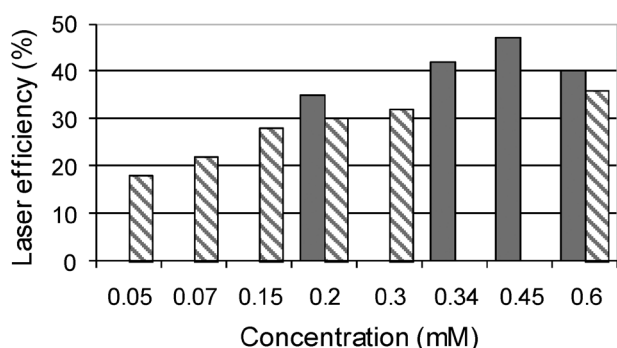
Although the presence of the 7-substituted groups in the new dyes studied in this work results in a red-shift of their

spectral bands, there still remains in these derivatives some absorption at 532 nm allowing them to be pumped with radiation at this standard wavelength. In our experimental setup an optical density of the dye in the sample of *ca.* 20 was used, which gives rise to an emitted beam with near-circular cross-section and optimizes the laser efficiency (ratio between the energy of the dye laser output and the energy of the pump laser incident on the sample surface). The low absorption of some of the new dyes at 532 nm (especially compounds 4 and 5) demanded the preparation of highly concentrated solutions in order to reach the required optical density. This resulted in solubility problems as well as in quenching of emitting states, which prevented the laser action or, in the best cases, decreased significantly the lasing efficiency. To avoid this drawback, we also analyzed the laser behaviour of the new dyes under transversal pumping with radiation at wavelengths near to their absorption maxima: 570 nm for compound 3 and 590 nm for compounds 4, 5 and 6.

Under these experimental conditions, broad-line-width laser emission with a pump threshold energy of ~0.8 mJ, beam divergence of ~5 mrad and pulse duration of ~8 ns FWHM was obtained from the new dyes when placed in a simple plane–plane non-tunable resonator (Fig. 4).

To optimize the laser action, firstly we analyzed the dependence of the laser emission of the new BODIPY derivatives on the

**Fig. 4** Laser emission in the green-red spectral region from the new dyes pumped at wavelengths near their absorption maxima. The broadening of the laser emission band from dye 5 is related to its high ICT strength.



**Fig. 5** Lasing efficiency of compounds **2** (grey bars) and **6** (lined bars) as a function of the dye concentration in ethyl acetate solutions pumped at 532 nm and 590, respectively.

corresponding dye concentration, varying the optical densities in ethyl acetate while keeping constant all the other experimental parameters. As an example, the results obtained for compounds **2** and **6** are shown in Fig. 5. All the other dyes pumped at both wavelengths, 532 nm and those near their absorption maxima, follow a similar behaviour. The lasing efficiency of all the analyzed solutions increased significantly with the dye concentration until a maximum value was reached (see Table 3). From this point on, further increases in dye concentration result in a slight decrease of lasing efficiency that can be related to the increase of reabsorption/reemission processes with deleterious effects in the laser action.

The actual effect of the solvent on the dye laser action was analyzed in solutions of nonpolar, polar nonprotic and polar protic solvents at the dye concentrations that optimized the corresponding laser efficiency of each derivative. At these concentrations, the low solubility of the compounds **3** and **5** in most solvents hampered the analysis of the influence of the media on the laser properties. In addition, the low solubility of some of the new dyes in hexane and acetonitrile prevents attaining the concentrated solutions required for laser experiments under the pumping conditions selected in the present work and, consequently, the later comparison with their optical properties.

In spite of the mentioned solubility problems, the new dyes when properly solved in adequate solvents exhibited efficient laser action showing good correlation with their photophysical properties in dilute solutions (Table 3): (i) the presence of 7-electron-donating substituents in the BODIPY core red-shifts the laser emission up to 720 nm while the 7-benzene substituted BODIPY (compound **2**) lases at 565 nm; (ii) the higher the fluorescence quantum yield, the higher the lasing efficiency (up to 51%, 57%, 28%, 26% and 39% for compounds **2**, **3**, **4**, **5** and **6** respectively); (iii) according to the solvent influence on the photophysical properties, the laser action of compounds with a  $\pi$ -conjugation extension (**2** and **3**) or substituted with a weak electron-donor group in position 7 (**6**) does not show pronounced sensitivity to the solvent, and only compound **4** exhibits a remarkable dependence on the solvent polarity. In fact, an increase in the solvent polarity leads to both a decrease

**Table 3** Laser parameters<sup>a</sup> of the new BODIPY dyes<sup>b</sup> in different solvents pumped at 532 nm and at their maxima absorption wavelength, under identical experimental conditions. Electron states studies of compounds **2–6**

	$\lambda_{\text{laser}}/\text{nm}$	Eff (%)	In(%) [ <i>n</i> ]	$\lambda_{\text{laser}}/\text{nm}$	Eff (%)	In(%) [ <i>n</i> ]
Dye <b>2</b>	$\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$					
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	565	46	98 [75 000]			
EtAcO	563	51				
Acetone	561	48				
MeOH	556	49				
EtOH	559	49				
F <sub>3</sub> -EtOH	556	50				
Dye <b>3</b>	$\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$			$\lambda_{\text{exc}} = 570 \text{ nm}$		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	599	45		596	57	100 [75 000]
CHCl <sub>3</sub>	607	31		604	36	
Dye <b>4</b>	$\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$			$\lambda_{\text{exc}} = 590 \text{ nm}$		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	702	24		709	28	80 [75 000]
EtAcO	704	18		690	20	
Acetone	696	10		720	13	
EtOH	696	6		704	9	
Dye <b>5</b>				$\lambda_{\text{exc}} = 590 \text{ nm}$		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>				738	26	75 [75 000]
EtAcO				724	20	
Dye <b>6</b>	$\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$			$\lambda_{\text{exc}} = 590 \text{ nm}$		
Hexane	653	9		656	39	94 [75 000]
EtAcO	659	8		660	36	
Acetone	656	8		659	35	
MeOH	648	5		652	34	
EtOH	653	6		656	32	
F <sub>3</sub> -EtOH	660	5		663	34	

<sup>a</sup> Energy band gap, determined from UV-Vis absorption spectra.  $\lambda_{\text{laser}}$ : peak wavelength of the laser emission; Eff: energy conversion efficiency; In(%): percent intensity of the laser output after [*n*] pump pulses, referred to the initial intensity  $I_0$ ;  $\text{In}(\%) = (I_0/I_n) \times 100$ . <sup>b</sup> Dye concentrations for pumping at 532 nm and at maximum absorption wavelengths, respectively: **2** ( $3.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ); **3** ( $8.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ); **4** ( $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ ); **5** ( $5.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) and **6** ( $6.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ).

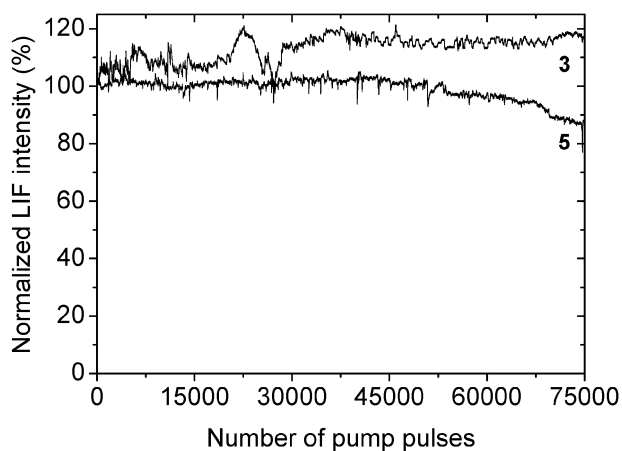
of its lasing efficiency (from 28% in dichloromethane to 9% in ethanol) and an increase of its emission bandwidth (from 5 nm in dichloromethane to 12 nm in ethanol); (iv) compound **4** in ethanol exhibits a lasing efficiency of up to 9% in spite of a low fluorescence quantum yield (0.15) that maybe related to a very high Stokes shift ( $1450\text{ cm}^{-1}$ ), which reduces the losses in the resonator cavity associated with reabsorption/reemission phenomena.<sup>10</sup>

It has to be pointed out that these new dyes when pumped at wavelengths near their absorption maxima follow a similar behaviour to that described above for pumping at 532 nm, while increasing in some cases their laser efficiencies by a factor of up to 5.3 (see Table 3).

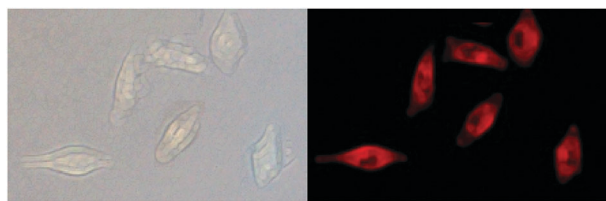
The lasing photostability of the dyes was analyzed in ethyl acetate and their concentrations were adjusted so that the laser action was optimum in all cases. The dye solutions were pumped at 532 nm and/or at their maximum wavelengths and at 10 Hz repetition rate. The photostability results are reported in Table 3 and, for the sake of clarity, the evolution of the laser output of two of the dyes (compounds **3** and **5**) as a function of number of pump pulses is plotted in Fig. 6. The new dyes result to be highly photostable since, after 75 000 pump pulses, compounds **2**, **3** and **6** maintain their initial laser output without any sign of degradation while the laser emission of compounds **4** and **5** drops by less than 20% and 25%, respectively, with respect to their initial output.

Although the photobleaching of dyes can occur by several different mechanisms and, from a general point of view, can be considered to be quite complex, thermo-degradation and photo-oxidation can be considered to be the main ones. Since the photostability of the new dyes decreases according to the corresponding oxidation potentials, the photo-oxidation, in which chemically reactive singlet oxygen is formed by sensitization of ground-state triplet oxygen molecules by a triplet state dye,<sup>11</sup> probably is the degradation mechanism with strongest relevance.

Attending to lasing efficiency and photostability, the herein studied dyes enhance the laser action of well-known dyes that lase at the same wavelength. Thus, under the same pumping



**Fig. 6** Normalized laser output as a function of the number of pump pulses for dyes **3** and **5** in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  solutions pumped at 570 and 590 nm, respectively, with pulses of 12 ns, 5 mJ and 10 Hz as repetition rate.



**Fig. 7** Left: bright-field image of MCF-7 cells. Right: fluorescence images of MCF-7 cells ( $\lambda_{\text{exc}} = 488\text{ nm}$ ). MCF-7 cells were incubated with **6** ( $10\text{ }\mu\text{L}$ ,  $10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ ) for 30 min at room temperature.

conditions, Pyrromethene 567 lases at 560 nm with an efficiency of 55% but loses its emission after 60 000 pulses; purified Perylene Red exhibits an efficiency of 26% at *ca.* 610 nm and maintains 70% of its initial emission after 80 000 pump pulses. Rhodamine 640 lases at 640 nm with an efficiency of 40% but with low photostability since its emission drops to 45% of its initial value after 60 000 pump pulses. Nile Blue lases at 698 nm with an efficiency of 23% but with very low photostability, losing its emission after just 10 000 pump pulses.

### 3.3 Selected dye for cellular imaging

To test the practical applicability of these highly fluorescent dyes, breast cancer (MCF-7) cells were treated with compound **6** in water, due to its high fluorescence quantum yield. Although compound **3** shows a similar fluorescence quantum yield, dye **6** exhibits also red shifted fluorescence emission, which provides larger Stokes shifts, a crucial factor to allow high-sensitive bioimaging. Fig. 7 shows fluorescent microscopy images of MCF-7 cells stained with **6**, obtained by excitation with  $\lambda = 488\text{ nm}$ . It showed a clear red intracellular fluorescence, which suggested that **6** was cell permeable. The cells remained viable and no apparent toxicity and side effects were observed throughout the imaging experiments (about 1–2 h). The cell imaging experiment indicates that compound **6** could be a competitive candidate for biological applications.

## 4. Conclusions

New long-wavelength BODIPY derivatives have been synthesized through comparison and combination of two strategies, extension of  $\pi$ -conjugation and adjustment of ICT effects. Some of the new dyes exhibit high absorption probability, high fluorescence capacity, narrow spectra shapes and low sensitivity to solvent polarity. Even compounds **4** and **5**, in which the presence of a triphenylamino and a tetrahydroquinoline groups, respectively, reduce the fluorescence quantum yield and broad emission bands in polar solvents, exhibit longer wavelength emissions and large Stokes shifts. These photophysical properties allow defining the new BODIPY derivatives as good laser dyes in the red-edge spectral region since, attending to lasing efficiency and photostability, the herein studied dyes enhance the laser action of well-known dyes that lase at the same wavelengths. Besides, these advantageous characteristics assure also their potential application as new biological tools.

## Acknowledgements

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 20876022), the Fundamental Research Funds for the Central University (DUT10ZD114) and Spanish MICINN under Projects MAT MAT2010-20646-C04-01 and TRACE2009-0144. V. Martín and M. E. Pérez-Ojeda thank Spanish CSIC for their JAE-postdoctoral and JAE-predocctoral contracts, respectively.

## Notes and references

- (a) V. Ntziachristos, J. Ripoll, L. H. V. Wang and R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.*, 2005, **23**, 313–320; (b) Y. Chen, A. Graham, W. Potter, J. Morgan, L. Vaughan, D. A. Bellnier, B. W. Henderson, A. Oseroff, T. J. Dougherty and R. K. Pandey, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 255–258; (c) A. Ajayaghosh, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 449–459; (d) A. Gómez-Hens and M. P. Aguilar-Caballeros, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2004, **23**, 127–136; (e) T. J. Dougherty, C. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, **90**, 889–905.
- Tunable Laser Applications*, ed. F. J. Duarte, CRC Press, Boca Raton, USA, 2009.
- (a) K. Umezawa, Y. Nakamura, H. Makino, D. Citterio and K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 1550–1551; (b) G. M. Fischer, A. P. Ehlers, A. Zumbusch and E. Daltrozzo, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 3750–3753; (c) A. Wakamiya, K. Mori and S. Yamaguchi, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 4273–4276; (d) J. Chen, A. Burghart, A. Derecskei-Kovacs and K. Burgess, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 2900–2906; (e) Z. Zhang and S. Achilefu, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 2067–2070; (f) S. Atilgan, Z. Ekmeckci, A. L. Dogan, D. Guc and E. U. Akkaya, *Chem. Commun.*, 2006, **42**, 4398–4400; (g) T. Rohand, W. Qin, N. Boens and W. Dehaen, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 4658–4663; (h) C.-W. Wan, A. Burghart, J. Chen, F. Bergström, L. B.-A. Johansson, M. F. Wolford, T. G. Kim, M. R. Topp, R. M. Hochstrasser and K. Burgess, *Chem.–Eur. J.*, 2003, **9**, 4430–4441.
- (a) Y. Xiao, F. Liu, X. Qian and J. Cui, *Chem. Commun.*, 2005, 239–241; (b) M. Fu, Y. Xiao, X. Qian, D. Zhao and Y. Xu, *Chem. Commun.*, 2008, 1780–1782; (c) D. Zhang, Y. Wen, Y. Xiao, G. Yu, Y. Liu and X. Qian, *Chem. Commun.*, 2008, 4777–4779; (d) Y. Zhou, Y. Xiao, S. Chi and X. Qian, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 633–636.
- (a) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, ed. R. P. Haugland, Molecular Probes, Eugene, OR, 1996; (b) A. Loudet and K. Burgess, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4891–4932; (c) G. Ulrich, R. Ziessel and A. Harriman, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 1184–1201; (d) J. P. Rostron, G. Ulrich, P. Retailleau, A. Harriman and R. Ziessel, *New J. Chem.*, 2005, **29**, 1241–1244.
- (a) S. Goeb and R. Ziessel, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 737–740; (b) Z. Shen, H. Röhr, K. Rurack, H. Uno, M. Spieles, B. Schulz, G. Reck and N. Ono, *Chem.–Eur. J.*, 2004, **10**, 4853–4871; (c) W. Zhao and E. M. Carreira, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 1677–1679; (d) K. Umezawa, A. Matsui, Y. Nakamura, D. Citterio and K. Suzuki, *Chem.–Eur. J.*, 2009, **15**, 1096–1106.
- (a) K. Rurack, M. Kollmannsberger and J. Daub, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2001, **40**, 385–387; (b) A. Burghart, H. Kim, M. B. Welch, L. H. Thoresen, J. Reibenspies, K. Burgess, F. Bergström and L. B.-A. Johansson, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 7813–7819; (c) A. Gorman, J. Killoran, C. O'Shea, T. Kenna, W. M. Gallagher and D. F. O'Shea, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 10619–10631; (d) Y. Yu, A. B. Descalzo, Z. Shen, H. Röhr, Q. Liu, Y. Wang, M. Spieles, Y. Li, K. Rurack and X. You, *Chem.–Asian J.*, 2006, **1**–2, 176–187.
- M. Baruah, W. Qin, C. Flors, J. Hofkens, R. A. L. Vallee, D. Beljonne, M. Van der Auweraer, W. M. De Borggraeve and N. Boens, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 5998–6009.
- (a) A. Coskun and E. U. Akkaya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 14474–14475; (b) T. Cheng, Y. Xu, S. Zhang, W. Zhu, X. Qian and L. Duan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 16160–16161.
- J. Bañuelos Prieto, F. López Arbeloa, V. Martínez Martínez, T. Arbeloa López and I. López Arbeloa, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 5503–5508.
- A. Tyagi, D. del Agua, A. Penzkofer, O. García, R. Sastre, A. Costela and I. García-Moreno, *Chem. Phys.*, 2007, **342**, 201–214.





Cite this: *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 11513–11515

www.rsc.org/chemcomm

## COMMUNICATION

## Unprecedented laser action from energy transfer in multichromophoric BODIPY cassettes†

Yi Xiao,<sup>\*a</sup> Dakui Zhang,<sup>a</sup> Xuhong Qian,<sup>\*b</sup> Angel Costela,<sup>c</sup> Inmaculada Garcia-Moreno,<sup>\*c</sup> Virginia Martin,<sup>c</sup> M. Eugenia Perez-Ojeda,<sup>c</sup> Jorge Bañuelos,<sup>\*d</sup> Leire Gartzia<sup>d</sup> and Iñigo López Arbeloa<sup>d</sup>

Received 29th June 2011, Accepted 1st September 2011

DOI: 10.1039/c1cc13874j

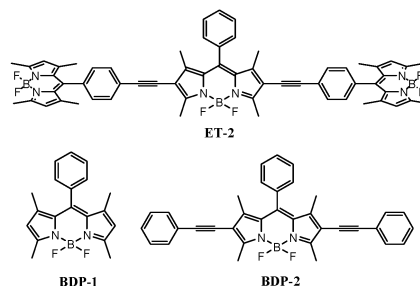
A cassette molecule, featuring direct integration of two donor BODIPY units to one acceptor BODIPY unit, was conveniently developed as the first highly “through-bond energy transfer” (TBET) laser dye. This multicolor absorbing dye exhibited highly efficient and photostable laser action under drastic pumping conditions.

Renewed interest has been focused on the design and synthesis of fluorophores with enhanced optical properties for newer applications in medical, analytic, physics, and biophysics science and technology.<sup>1</sup> Although a wealth of organic dyes are known, unfortunately they still have to overcome some limitations related to: (1) low absorption over broad spectral regions and (2) high photobleaching rate, which becomes especially important under drastic excitation conditions such as those required in single molecule detection methods.<sup>2</sup> An attractive approach to overcome these drawbacks has been the straightforward synthesis of energy transfer cassettes to span the absorption spectra of dyes, which result in large pseudo-Stokes shifts and, not least important, in improved photostability.<sup>3</sup> This powerful strategy has been exploited in light-harvesting systems and sensors but never focused to enhance lasing properties for advanced applications.

To address this issue, we have synthesized a rigid energy transfer cassette, **ET-2**, via a facile and efficient strategy tandem Sonogashira coupling (Chart 1 and ESI†). Different from other previous multichromophoric dyes with donor and acceptor connected by flexible and relatively long chains,<sup>3</sup> trifluorophoric **ET-2** features compact integration of two donor BODIPY (**BDP-1**) units to one acceptor BODIPY (**BDP-2**) by a single C–C bond which leads to a short

donor–acceptor distance and favours ultrafast excited energy transfer. The strong steric congestion blocks the twist of the single bond spacer and forces the connected two parts to take a perpendicular orientation, avoiding the system to behave as a single conjugated dye.

The absorption spectrum of **ET-2** is essentially equal to the sum of the absorption bands of the free **BDP-1** donor (500 nm) and **BDP-2** acceptor (570 nm) components (Fig. 1). This indicates that the **ET-2** fluorophore behaves as a cassette since both chromophoric units are electronically decoupled in the ground state and remain as individual patterns in the multichromophoric compound, according to the theoretically predicted optimized ground-state geometry (Fig. 1, inset). The fluorescence spectrum of **ET-2** under excitation at 470 nm, where the donor absorbs intensively while the acceptor hardly absorbs, results in a very weak residual emission near 510 nm from the donor and a strong emission centred at 600 nm from the acceptor (Fig. 1). Thus, the shift between fluorescence and absorption maxima is higher than 6000 cm<sup>−1</sup> exciting the cassette at the S<sub>0</sub> → S<sub>1</sub> donor transition. In addition, the corresponding excitation spectrum of **ET-2**, recorded monitoring the emission in the acceptor region (660 nm), perfectly matches the corresponding absorption spectrum and clearly shows the absorption bands of the parent chromophores. These results indicate a highly efficient intramolecular excitation energy transfer from the donor to the acceptor. Fluorescence quantum yield data provide also solid evidence for this energy transfer phenomena. Since the corresponding bands from the donor and acceptor units are resolved in the **ET-2** fluorescence spectrum, separate quantum yields ( $\Phi$ ) for



**Chart 1** Molecular structures of **ET-2** cassette and donor **BDP-1** and acceptor **BDP-2** units.

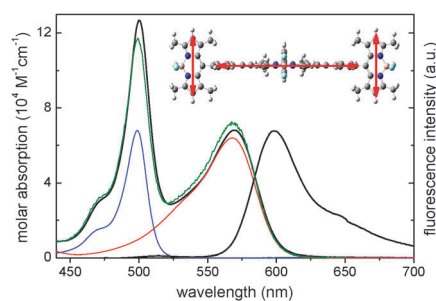
<sup>a</sup> State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116012, China. E-mail: xiaoyi@dlut.edu.cn; Fax: 86 411 84986251; Tel: 86 411 84986252

<sup>b</sup> Shanghai Key Laboratory of Chemical Biology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China. E-mail: xhqian@ecust.edu.cn

<sup>c</sup> Instituto de Química-Física “Rocasolano”, CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain. E-mail: iqfr84@iqfr.csic.es

<sup>d</sup> Dpto Química Física, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), 644, 48080 Bilbao, Spain. E-mail: jorge.bañuelos@ehu.es

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental procedures and full characterizations data. See DOI: 10.1039/c1cc13874j



**Fig. 1** Absorption (black), fluorescence ( $\lambda_{\text{exc}} = 470$  nm, black) and excitation ( $\lambda_{\text{em}} = 660$  nm, green) spectra of **ET-2**, together with transition moment orientations. The absorption spectra of **BDP-1** (blue) and **BDP-2** (red) are also shown.

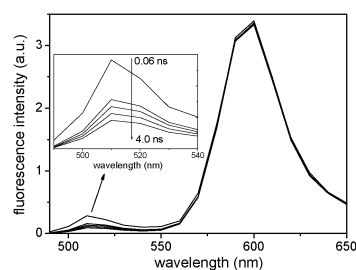
both emissions can be defined and calculated (Table 1). The fluorescence quantum yield of **ET-2** (0.59) is almost independent of the excitation wavelength, within the donor and acceptor absorption ranges, and is quite similar to that exhibited by the free **BDP-2** component excited at 575 nm. The absence of the fluorescence quantum yield dependence suggests almost complete energy transfer from the donor to the acceptor. Furthermore, taking into account that the **BDP-2** dye excited at 470 nm exhibits a fluorescence quantum yield near zero, the **ET-2** dye allows reaching a significant “fluorescence enhancement”, defined as the ratio of the fluorescence intensity of the cassette to that of corresponding acceptor excited at the short wavelength. The rigidity of the **ET-2** cassette plays a main role since this avoids the deactivation *via* internal conversion mechanism and enhances the efficiency of the energy transfer process. So, the cassette **ET-2** not only extends the absorption of **BDP-2** into the blue spectral region but also converts it in a more sensible chromophore activated for two donor fragments.

In the **ET-2** cassette, the donor and acceptor units connected by conjugated linker may transfer energy *via* different pathways,<sup>4</sup> including “through-space” energy transfer as well as other pathways usually referred to as “through-bond” energy transfer. To ascertain the contribution of each to the whole energy transfer process may not be a simple matter, especially in cassettes with donor and acceptor fragments relatively close and with flexible linkers. As shown in Fig. 1, the perpendicular disposition of the donor and acceptor

transition moments in the **ET-2** molecule eliminates the orientation term  $\kappa$  in the Förster equation.<sup>5</sup> Thus, even though the spectral overlap between the donor emission and the acceptor absorption is good, the dipole–dipole contribution to the intramolecular energy transfer should be negligible, and, consequently, this process should take place *via* a through-bond mechanism.<sup>6</sup>

Time-resolved emission techniques allow getting insight into the dynamics of the energy transfer process. The acceptor fluorescence time profile in the **ET-2** cassette appears to be monoexponential and is essentially identical to that of the free **BDP-2** dye. However, the lifetime of the donor, 3.55 ns, is drastically affected by the presence of the acceptor, since upon binding to **BDP-2** in **ET-2**, its fluorescence decay becomes multiexponential (Table 1). The lowest contributions correspond to a long lifetime (3.17 ns), assigned to the residual donor emission, and to an intermediate lifetime (1.68 ns) whose assignment will be discussed later. The main contribution corresponds to very short lifetime ( $\sim 20$  ps), in the limit of our single-photon counter time-resolution, which is assigned to the energy transfer process. This fast emission from the donor together to the highly increased fluorescence quantum yield from the acceptor (59%), confirm the high efficiency of the energy transfer ( $k_{\text{ET}} \sim 5 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$ ) *via* a through-bond mechanism.<sup>6</sup> Scanning the gated fluorescence spectrum of **ET-2** at different delay times following excitation at 470 nm produces a sequence of time-resolved emission spectra (Fig. 2), which show a decay of the donor emission, quenched by this fast energy transfer, and the growth of the acceptor emission.

The photophysics of the **ET-2** cassette is sensitive to its concentration, which allows the unambiguous assignment of the intermediate lifetime observed above. The analysis of its fluorescence, upon excitation at 470 nm and at high concentration (0.7 mM), reveals an increase in the donor/acceptor emission ratio with respect to that recorded in diluted solutions together to a different weight of each lifetime in the multiexponential fit of the decay curve (Table 1). This result could be indicating that some energy may be transferred through an intermolecular Förster resonance process (*inter*-FRET) *via* dipole–dipole coupling assuming randomly distributed neighboring transition moments. Hence, the overall excitation energy transfer in **ET-2** should result from the contribution of intramolecular through-bond and intermolecular through-space mechanisms. Therefore, at high concentration, the lifetime component assigned to the through-bond energy transfer increases, from 20 to 100 ps, decreasing its contribution,



**Fig. 2** Normalized time-resolved emission spectra of **ET-2** at different times after excitation; 0.06, 0.3, 1, 2 and 4 ns.

**Table 1** Photophysical properties in ethyl acetate<sup>a</sup>

Dye	$\epsilon/\lambda_{\text{abs}}$	$\lambda_{\text{exc}}$	$\lambda_{\text{em}}$	$\Phi$	$\tau/\text{ns}$
<b>BDP-1</b>	71600 (503)	470	510	0.66	3.55
<b>BDP-2</b>	65800 (568)	575	600	0.57	3.78
<b>ET-2</b> (2 $\mu\text{M}$ )	127000 (503)	470	510	$\sim 0$	0.020 (92%)
					1.68 (5%)
					3.17 (3%)
					3.46
<b>ET-2</b> (0.7 mM)	68200 (569)	470	600	0.59	3.46
					0.103 (27%)
					1.91 (54%)
					3.58 (19%)
					3.48

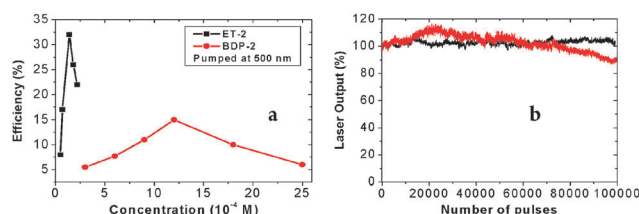
<sup>a</sup>  $\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ : molar absorption;  $\lambda_{\text{abs}}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}$ ,  $\lambda_{\text{em}}$  (nm): absorption, excitation and emission wavelengths;  $\Phi$ : fluorescence quantum yield;  $\tau$ : fluorescence lifetime.

**Table 2** Laser properties (efficiency,  $\eta$  and maximum output wavelength  $\lambda_{\text{out}}/\text{nm}$ ) of **ET-2** and **BDP-2** dependent on pump sources and solvents

$\lambda_{\text{pump}}/\text{nm}$	<b>ET-2</b>						<b>BDP-2</b>					
	500		532		570		500		532		570	
$c/\text{M}$	$1.4 \times 10^{-4}$		$8.0 \times 10^{-4}$		$2.2 \times 10^{-4}$		$1.2 \times 10^{-3}$		$4.0 \times 10^{-4}$		$1.6 \times 10^{-4}$	
Solvent	$\eta$	$\lambda_{\text{out}}$	$\eta$	$\lambda_{\text{out}}$	$\eta$	$\lambda_{\text{out}}$	$\eta$	$\lambda_{\text{out}}$	$\eta$	$\lambda_{\text{out}}$	$\eta$	$\lambda_{\text{out}}$
Ethyl acetate	32%	609	32%	624	39%	610	15%	622	35%	619	36%	610
THF	21%	612	—	—	24%	615	10%	612	24%	622	24%	619
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	26%	613	23%	624	28%	616	11%	623	30%	619	28%	616

from 92 to 27%, to the total fluorescence decay curve of **ET-2** at 510 nm. At the same time, the contribution of the longest lifetime increases, according to the observed increase of the donor emission, which could be related to donor–donor energy migration (see ESI†). Even more significant is the increase of the intermediate lifetime, attributed to the donor–acceptor *inter*-FRET process, which appears also in diluted solution but with a ten times lower contribution (Table 1). The lifetime assignment is also confirmed adding free donor or acceptor to highly concentrated solutions of **ET-2** (ESI†).

The optimized photophysics of the **ET-2** cassette leads to its enhanced behaviour as a laser dye compared to that of the donor and acceptor components, since it lases efficiently under pumping at three different relevant wavelengths; 500, 532 and 570 nm (Table 2). Upon pumping at 500 nm, the laser properties of **BDP-2** are inferior due to its lower absorption in this region, which requires a concentration 10 times higher than that of **ET-2** (Fig. 3a). But even at this concentration, or because such a high concentration is required, the highest laser efficiency of **BDP-2** is only 15%, less than half the efficiency reached with **ET-2** (32%). In addition, under excitation at 500 nm, the lasing threshold of **BDP-2** (0.9 mJ) is much higher than that of **ET-2** (0.4 mJ). Moreover, **ET-2** exhibits excellent photostability, even better than that of **BDP-2**, since **ET-2** maintains 100% of its initial emission after  $1 \times 10^5$  pump pulses at 10 Hz repetition rate, while **BDP-2** loses 10% of its initial emission under the same pumping conditions (Fig. 3b). These encouraging results led us to initiate a systematic investigation on the applications of **ET-2** in solid lasers. In a preliminary study, this dye dissolved in PMMA and pumped at 500 nm lases at 620 nm with an efficiency of 24% and high photostability, maintaining 93% of its initial emission after  $1 \times 10^5$  pump pulses.



**Fig. 3** (a) Laser efficiency of **ET-2** (black) and **BDP-2** (red) dependent on the concentrations in ethyl acetate ( $\lambda_{\text{pump}} = 500 \text{ nm}$ ) (b) normalized laser output of **ET-2** and **BDP-2** as a function of the number of pump pulses at 532 nm, 5.5 mJ and 10 Hz repetition rate.

In summary, the highly straightforward synthesis of an efficient “through-bond energy transfer” cassette allows enhancing significantly the already valuable photophysical and laser properties of BODIPYs. Compared to “unmodified” BODIPY dyes, the new multichromophoric system spans the absorption spectrum into a broad region, exhibiting high molar extinction coefficients with enhanced fluorescence emission and increased Stokes shifts. This enhanced photophysics assures an unprecedented highly efficient and photostable laser action under drastic pumping conditions from a cassette in both liquid solutions and solid-state, suggesting that the new photonic system could perform outstandingly in advanced applications in optoelectronics and biophotonics.

Y. X. thanks National Natural Science Foundation of China (No. 20876022) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. DUT10ZD114), and I. G.-M. and I. L. A. thank Spanish MICINN (MAT2010-20464-C04-01 and -C04-4, respectively, and TRACE2009-0144) for financial support.

## Notes and references

- (a) G. Ulrich, R. Ziessel and A. Harriman, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 1184; (b) B. Abrams, Z. Diwu, O. Guryev, S. Aleshkov, R. Hingorani, M. Edinger, R. Lee, J. Link and T. Dubrovsky, *Anal. Biochem.*, 2009, **386**, 262; (c) G. Mitronova, V. Belov, M. Bossi, C. Wurm, L. Meyer, R. Medda, G. Moneron, S. Bretschneider, C. Eggeling, S. Jakobs and S. Hell, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 4477.
- (a) R. Tsien, L. Ernst and A. Waggoner, *Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry*, in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, ed. J. Pawley, Springer, New York, 3rd edn, 2006, p. 338; (b) B. Huang, W. Wang, M. Bates and X. Zhuang, *Science*, 2008, **319**, 810; (c) J. Lippincott-Schwartz and S. Manley, *Nat. Methods*, 2009, **6**, 21.
- (a) D. McQuade, A. Pullen and T. Swager, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 2537; (b) C. Wan, A. Burghardt, J. Chen, F. Bergström, L. Johansson, M. Wolford, T. Kim, M. Topp, R. Hochstrasser and K. Burgess, *Chem.-Eur. J.*, 2003, **9**, 4430; (c) A. Coskun and E. Akkaya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 10464; (d) X. Zhang, Y. Xiao and X. Qian, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 29.
- S. Speiser, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 1953.
- J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2nd edn, 1999.
- (a) T. Kim, J. Castro, A. Loudet, J. Jiao, R. Hochstrasser, K. Burgess and M. Topp, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 20; (b) R. Ziessel, C. Goze, G. Ulrich, M. Césario, P. Retailleau, A. Harriman and J. Rostron, *Chem.-Eur. J.*, 2005, **11**, 7366; (c) A. Harriman, L. Mallon, S. Goeb, G. Ulrich and R. Ziessel, *Chem.-Eur. J.*, 2009, **15**, 4553; (d) O. Bozdemir, Y. Cakmak, F. Sozmen, T. Ozdemir, A. Siemiarz and E. Akkaya, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 6346; (e) J. Han, A. Loudet, R. Barhoumi, R. Burghardt and K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 1642; (f) W. Lin, L. Yuan, Z. Cao, Y. Feng and J. Song, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 375.



# Highly efficient and photostable photonic materials from diiodinated BODIPY laser dyes

M. Eugenia Pérez-Ojeda,<sup>1,\*</sup> Cliferson Thivierge,<sup>2</sup> Virginia Martín,<sup>1</sup> Ángel Costela,<sup>1</sup> Kevin Burgess,<sup>2</sup> and Inmaculada García-Moreno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Sistemas de Baja Dimensionalidad, Superficies y Materia Condensada, Instituto de Química-Física "Rocasolano" (CSIC), Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Texas A&M University, PO Box 30012, College Station, TX 77842-3012, USA  
[\\*elma@iqfr.csic.es](mailto:*elma@iqfr.csic.es)

**Abstract:** Highly efficient and photostable laser parameters were observed for the diiodinated BODIPY derivatives **1** – **3** both in liquid phase and incorporated into polymeric matrices. The laser samples were transversely pumped at wavelengths near their absorption maxima (515 and 532 nm) at 5 mJ/pulse and 10 Hz repetition rate; these are conditions that would induce photodegradation of many laser-active fluors. Under these extreme conditions, the new dyes exhibit laser action from 530 nm to 625 nm with remarkable efficiencies, up to 55% in liquid solutions and 45% in poly(methylmethacrylate), and with high photostability since the laser output remains at the initial level, with no sign of degradation, after 100000 pump pulses in the same position of the sample. The efficiencies and photostabilities of the new dyes outperform those of one presently commercialized and considered benchmarks over this spectral region (i.e. coumarines, xanthenes, perilendiimides). The enhanced optical properties recorded under drastic laser pumping conditions suggest that these new photonic systems could be outstanding in biophotonic applications like optical microscopy and nanoscopy, since they would allow very long observation times and improved spatial resolution.

©2011 Optical Society of America

OCIS codes: (140.3600) Lasers, tunable; (140.3380) Lasers, materials.

---

## References and links

1. F. J. Duarte, ed., *Tunable Laser Applications*, 2nd ed. (CRC Press, Boca Raton, 2008).
2. E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science* **313**(5793), 1642–1645 (2006).
3. S. W. Hell, "Far-field optical nanoscopy," *Science* **316**(5828), 1153–1158 (2007).
4. M. Bates, B. Huang, G. T. Dempsey, and X. Zhuang, "Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes," *Science* **317**(5845), 1749–1753 (2007).
5. X. Zhuang, "Nano-imaging with Storm," *Nat. Photonics* **3**(7), 365–367 (2009).
6. S. W. Hell, "Microscopy and its focal switch," *Nat. Methods* **6**(1), 24–32 (2009).
7. J. Lippincott-Schwartz and S. Manley, "Putting super-resolution fluorescence microscopy to work," *Nat. Methods* **6**(1), 21–23 (2009).
8. H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, H. White, J. Gillette, S. Olenych, M. W. Davidson, and E. Betzig, "Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**(51), 20308–20313 (2007).
9. M. Bossi, J. Fölling, V. N. Belov, V. P. Boyarskiy, R. Medda, A. Egner, C. Eggeling, A. Schönle, and S. W. Hell, "Multicolor far-field fluorescence nanoscopy through isolated detection of distinct molecular species," *Nano Lett.* **8**(8), 2463–2468 (2008).
10. V. P. Boyarskiy, V. N. Belov, R. Medda, B. Hein, M. Bossi, and S. W. Hell, "Photostable, amino reactive and water-soluble fluorescent labels based on sulfonated rhodamine with a rigidized xanthene fragment," *Chemistry* **14**(6), 1784–1792 (2008).
11. B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, "Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy," *Science* **319**(5864), 810–813 (2008).

12. B. Huang, S. A. Jones, B. Brandenburg, and X. Zhuang, "Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution," *Nat. Methods* **5**(12), 1047–1052 (2008).
13. R. Y. Tsien, L. Ernst, and A. Waggoner, "Fluorophores for confocal microscopy: photophysics and photochemistry," in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3th ed., J. B. Pawley, ed. (Springer, 2006).
14. A. Loudet and K. Burgess, "BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties," *Chem. Rev.* **107**(11), 4891–4932 (2007).
15. G. Ulrich, R. Ziessel, and A. Harriman, "The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**(7), 1184–1201 (2008).
16. A. B. Descalzo, H. J. Xu, Z. Shen, and K. Rurack, "Red/near-infrared boron-dipyrromethene dyes as strongly emitting fluorophores," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1130**(1), 164–171 (2008).
17. A. Costela, I. García-Moreno, and R. Sastre, "Materials for solid-state dye lasers," in *Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices*, H. S. Nalwa, ed. (Academic, 2001).
18. A. Costela, I. García-Moreno, and R. Sastre, "Polymeric solid-state dye lasers: recent developments," *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**(21), 4745–4763 (2003).
19. J. B. Prieto, T. Arbeloa, M. Liras, V. M. Martínez, and F. L. Arbeloa, "Concerning the color change of pyrromethene 650 dye in electron-donor solvents," *J. Photochem. Photobiol., A* **184**(3), 298–305 (2006).
20. J. Bañuelos, F. López Arbeloa, T. Arbeloa, S. Salleres, F. Amat-Guerri, M. Liras, and I. López Arbeloa, "Photophysical study of new versatile multichromophoric diads and triads with BODIPY and polyphenylene groups," *J. Phys. Chem. A* **112**(43), 10816–10822 (2008).
21. V. P. Yakubovskiy, M. P. Shandura, and Y. P. Kovtun, "Boradipyrromethenecyanines," *Eur. J. Org. Chem.* **2009**(19), 3237–3243 (2009).
22. Y. W. Wang, A. B. Descalzo, Z. Shen, X. Z. You, and K. Rurack, "Dihydronaphthalene-fused boron-dipyrromethene (BODIPY) dyes: insight into the electronic and conformational tuning modes of BODIPY fluorophores," *Chemistry* **16**(9), 2887–2903 (2010).
23. C. Thivierge, A. Loudet, and K. Burgess, "Brilliant BODIPY–fluorene copolymers with dispersed absorption and emission maxima," *Macromolecules* **44**(10), 4012–4015 (2011), doi:10.1021/ma200174w.
24. M. Álvarez, F. Amat-Guerri, A. Costela, I. García-Moreno, C. Gómez, M. Liras, and R. Sastre, "Linear and cross-linked polymeric solid-state dye lasers based on 8-substituted alkyl analogues of pyrromethene 567," *Appl. Phys. B* **80**(8), 993–1006 (2005).
25. A. Costela, I. García-Moreno, D. del Agua, O. García, and R. Sastre, "Highly photostable solid-state dye lasers based on silicon-modified organic matrices," *J. Appl. Phys.* **101**(7), 073110 (2007).
26. A. Costela, I. García-Moreno, C. Gomez, R. Sastre, F. Amat-Guerri, M. Liras, F. López Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, and I. López Arbeloa, "Photophysical and lasing properties of new analogs of the boron-dipyrromethene laser dye PM567 in liquid solution," *J. Phys. Chem. A* **106**(34), 7736–7742 (2002).
27. I. López Arbeloa, "Fluorescence quantum yield evaluation. Re-absorption and re-emission corrections," *J. Photochem.* **14**(2), 97–105 (1980).
28. I. García-Moreno, A. Costela, L. Campo, R. Sastre, F. Amat-Guerri, M. Liras, F. López Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, and I. López Arbeloa, "8-phenyl-substituted dipyrromethene BF<sub>2</sub> complexes as highly efficient and photostable laser dyes," *J. Phys. Chem. A* **108**(16), 3315–3323 (2004).
29. A. Costela, I. García-Moreno, M. Pintado-Sierra, F. Amat-Guerri, R. Sastre, M. Liras, F. L. Arbeloa, J. B. Prieto, and I. L. Arbeloa, "New analogues of the BODIPY dye PM597: photophysical and lasing properties in liquid solutions and in solid polymeric matrices," *J. Phys. Chem. A* **113**(28), 8118–8124 (2009).
30. J. Bañuelos-Prieto, A. R. Agarrabeitia, I. García-Moreno, I. López-Arbeloa, A. Costela, L. Infantes, M. E. Pérez-Ojeda, M. Palacios-Cuesta, and M. J. Ortiz, "Controlling optical properties and function of BODIPY by using asymmetric substitution effects," *Chemistry* **16**(47), 14094–14105 (2010).
31. G. Jones, S. Kumar, O. Klueva, and D. Pacheco, "Photoinduced electron transfer for pyrromethene dyes," *J. Phys. Chem. A* **107**(41), 8429–8434 (2003).
32. W. Zhao and E. M. Carreira, "Conformationally restricted aza-BODIPY: highly fluorescent, stable near-infrared absorbing dyes," *Chemistry* **12**(27), 7254–7263 (2006).
33. T. Rohand, W. Qin, N. Boens, and W. Dehaen, "Palladium-catalyzed coupling reactions for the functionalization of BODIPY dyes with fluorescence spanning the visible spectrum," *Eur. J. Org. Chem.* **2006**(20), 4658–4663 (2006).
34. R. Ziessel, G. Ulrich, and A. Harriman, "The chemistry of BODIPY: a new El Dorado for fluorescence tools," *N. J. Chem.* **31**(4), 496–501 (2007).
35. W. Qin, T. Rohand, W. Dehaen, J. N. Clifford, K. Driesen, D. Beljonne, B. Van Averbek, M. Van der Auweraer, and N. Boens, "Boron dipyrromethene analogs with phenyl, styryl, and ethynylphenyl substituents: synthesis, photophysics, electrochemistry, and quantum-chemical calculations," *J. Phys. Chem. A* **111**(35), 8588–8597 (2007).
36. K. Umezawa, Y. Nakamura, H. Makino, D. Citterio, and K. Suzuki, "Bright, color-tunable fluorescent dyes in the visible-near-infrared region," *J. Am. Chem. Soc.* **130**(5), 1550–1551 (2008).
37. R. Ziessel, G. Ulrich, A. Harriman, M. A. H. Alamiry, B. Stewart, and P. Retailleau, "Solid-state gas sensors developed from functional difluoroboradiazaindacene dyes," *Chemistry* **15**(6), 1359–1369 (2009).
38. I. García-Moreno, F. Amat-Guerri, M. Liras, A. Costela, L. Infantes, R. Sastre, F. López Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, and I. López Arbeloa, "Structural change in the BODIPY dye PM567 enhancing the laser action in liquid and solid media," *Adv. Funct. Mater.* **17**(16), 3088–3098 (2007).



39. A. Costela, I. García-Moreno, M. Pintado-Sierra, F. Amat-Guerri, M. Liras, R. Sastre, F. L. Arbeloa, J. B. Prieto, and I. L. Arbeloa, "New laser dye based on the 3-styryl analog of the BODIPY dye PM567," *J. Photochem. Photobiol., A* **198**(2-3), 192–199 (2008).
40. M. Álvarez, A. Costela, I. García-Moreno, F. Amat-Guerri, M. Liras, R. Sastre, F. López Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, and I. López Arbeloa, "Photophysical and laser emission studies of 8-polyphenylene-substituted BODIPY dyes in liquid solution and in solid polymeric matrices," *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**(7), 802–813 (2008).

## 1. Introduction

Many new applications for lasers are emerging; for instance there is considerable interest in developing them to give more useful as illumination sources for microscopy [1]. Laser-based microscopy is already well established in biomedicine and in life sciences, yielding three-dimensional images with high spatial resolutions, high sensitivities and discrete chemical or biomolecular selectivities [2–7]. This trend is particularly evident in single-molecule based detection technologies, where fluorescence correlation spectroscopy, fluorescence intensity distribution analysis, and photon-counting histogram analysis may create images showing sample properties that are not evident in ordinary microscopy [8–12].

Ongoing research on microscopy and imaging requires that organic fluorophores satisfy certain properties to be useful as fluorescence markers [13]. In the first place, high absorption cross-sections, fluorescence quantum yields, solubilities in water, and labeling efficiencies are required. Secondly, low rates of triplet, or dark-state formation, are desirable to assure high contrasted-images. Finally, high photostabilities are required so that the fluorescent markers can withstand large excitation intensities of laser light. This last requirement is demanding for most commonly used dyes, which exhibit good photostabilities under low laser intensities but high photobleaching rates when the excitation intensity increases, shortening the observation time and leading to a loss in brightness and, consequently, in the image resolution.

4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY or BDP) derivatives have favorable photophysical properties such as high absorption coefficients at visible wavelengths, high fluorescence quantum yields, low triplet-triplet absorptions, low tendencies for aggregation, and high photostabilities relative to other dyes (i.e. xanthenes, fluorescein, hemicyanines) [14–16]. Moreover, they are amenable to structural modifications involving introduction of substituents to tune their optical properties [14–16]. Unfortunately, some of BDP derivatives lack of photostability under intense laser irradiation, and display sensitivity to the polarity and/or pH of the solvent [17–22]. Conversely, systems with overall enhanced optical properties are likely to be facilitated new applications of BDP dyes as labels for biomolecules, chromogenic probes, fluorescent sensors, and as tunable laser dyes for liquid phase and in solid-state applications.

Featured here are studies to highlight the lasing potential of a series of diiodinated BDP dyes **1** – **3** shown in Fig. 1. These dyes have been previously reported as doping agents in polyfluorenes, tuning the emission wavelengths of these polymers [23]; they have fluorescence emissions dispersed between 530 and 625 nm. We find BDPs **1** – **3** exhibit highly efficient and photostable wavelength tunable laser actions under drastic laser-pumping conditions, in both liquid phase and solid state. Their properties, in this regard, are superior to those exhibited by some commercially available laser dyes like some coumarines, xanthenes, perileindiimides.

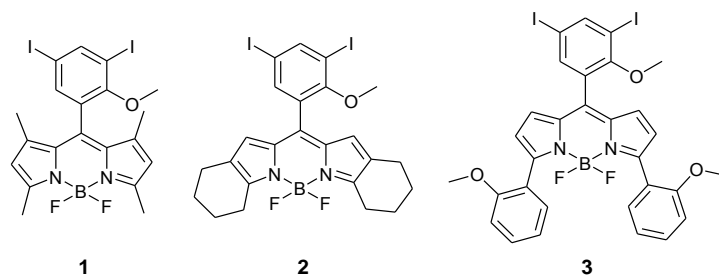


Fig. 1. Molecular structures of the featured BODIPY derivatives.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Details of the synthesis of the new BDP dyes have been reported elsewhere [23]. Commercial laser dye Coumarin 522 (laser grade, Exciton) was used as received with a purity > 99% (checked by spectroscopic and chromatographic methods). Solvents for laser studies were of spectroscopic grade (Merck, Aldrich or Sigma) and were used without purification. Methyl methacrylate (Merck) was distilled under reduced pressure before use. The initiator: 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN) (Acros) was also purified by recrystallization in ethanol before use.

### 2.2. Preparation of solid polymeric samples

The new BDP derivatives were incorporated into *poly*(methylmethacrylate) (PMMA) following a previously described procedure [24]. The solid monolith laser samples were cast in cylindrical shapes, forming rods of 10 mm diameter and 10 mm length. A cut was made parallel to the axis of the cylinder to obtain a lateral flat surface of ca. 6 mm × 10 mm. This surface as well as the ends of the laser rods were prepared for lasing experiments by using a grinding and polishing machine (Phoenix Beta 4000, Buehler) until optical-grade finished. The planar grinding stage was carried out with a P4000 (~6 μm) silicon carbide disk (Tecmicro) as an abrasive with mineral oil as a lubricant. The final polishing stage was realized using a cloth disk Mastertex (Buehler) with diamond of 1 μm in mineral oil as an abrasive type.

### 2.3. Laser experiments

Liquid solutions of dyes were contained in 1 cm optical-path quartz cells that were carefully sealed to avoid solvent evaporation during experiments. The solutions of the BDP dyes as well as the solid samples doped with these new dyes were transversely pumped at different wavelengths matching the maximum absorption of the corresponding dyes: at 532 nm, with 5 mJ/pulse, 6 ns full width at half maximum FWHM pulses from a frequency-doubled Q-switched Nd:YAG laser (Monocrom OPL-10) and at 515 nm, with 5 mJ, 12 ns FWHM pulses from a Nd:YAG-pumped dye laser (Spectron SL800 with an ethanolic solution of Coumarin 522). The exciting pulses were line-focused onto the cell (or onto the lateral flat surface of the solid sample) providing pump fluences on the active medium of 180 mJ/cm<sup>2</sup>. The oscillation cavity (2 cm length) consisted of a 90% reflectivity aluminum mirror, with the lateral face of the cell (or the end face of the solid sample) as output coupler.

The photostability of these dyes in liquid phase was analyzed under experimental conditions identical to those selected to irradiate the fluorophores when embedded in solid polymeric matrices, allowing a comparison, of their stability in both liquid solution and solid phase under laser irradiation. The irradiated volume in solid samples under the selected experimental conditions was estimated to be 10 μL, so capillary Pyrex tube (1 cm height, 1 mm internal diameter) carefully sealed into which solutions were incorporated to provide



irradiated volumes similar to those analyzed in the solid samples, thus preventing the refreshing of the pumped molecules by molecular diffusion and maintaining the same laser pump conditions in both cases.

The optical quality of the capillaries mentioned above precludes laser emission from the dyes, but information on photostabilities can be obtained by monitoring the decrease in laser-induced fluorescence intensity, excited transversally to the capillary, as a function of the number of pump pulses. The fluorescence emission was monitored perpendicular to the exciting beam, and its collection and analysis were carried out with the same set-up selected to characterize the laser emission from dyes incorporated into solid samples. In short, the fluorescence was collected by an optical fiber, and imaged onto the input slit of a monochromator (Acton Research corporation) and detected with a charge-coupled device (CCD) (SpectruMM:GS128B). The fluorescence emission was recorded by feeding the signal to the boxcar (Stanford Research, model 250) to be integrated before being digitized and processed by a computer. Each experience was repeated at least three times. The estimated error of the energy measurements was 10% and the experimental error in the photostability measurements was estimated to be on the order of 7%. Details of the experimental setup can be found elsewhere [25].

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Liquid phase

Initially, the laser derivatives were pumped at 532 nm, a usual wavelength utilized to pump laser dyes with emission in the yellow-red region of the visible spectra. An optical density for the dye solutions of ca. 20 was used so that the incoming pump radiation penetrates the sample (i.e. is absorbed) to a depth similar to the thickness of the pump stripe at the input face of the cell onto which the pumping radiation is focused ( $\approx 0.3$  mm). This gives rise to an emitted beam with near circular-cross-section, enhancing the laser efficiency (ratio between the energy of the dye laser output and the energy of the pump laser incident on the sample surface).

The absorption intensity of dye **1** at 532 nm was low so relatively concentrated solutions were used to reach the required optical density. Consequently, solubility problems and aggregation issues for this probe prevented the laser action or, in the best cases, decreased the lasing efficiency to a mere 0.6%. For this reason, this particular dye was analyzed by transverse pumping with laser radiation at 515 nm, i.e. a wavelength near to its absorption maximum [23]. Under these experimental conditions, broad-line-width laser emission with pump threshold energy of  $\approx 0.8$  mJ, beam divergence of  $\approx 5$  mrad and pulse duration of  $\approx 8$  ns FWHM was obtained from the new dyes when placed in a simple plane-plane non-tunable resonator. The dependence of the laser action of the new BDP derivatives on the corresponding dye concentration was analyzed in dichloromethane, a solvent in which the dyes show good solubility, varying the optical densities while keeping constant all the other experimental parameters (Figs. 2 and 3).

The lasing efficiency of all the analyzed dyes increase significantly with dye concentration, reaching a maximum value for solutions with concentrations in the range  $2.5\text{--}4.8 \times 10^{-4}$  M, depending on the dye. From this point on, further increases in dye concentration result in a slight decrease in lasing efficiency that can be related to the increase in re-absorption/re-emission processes with deleterious effect in the laser action (Fig. 2) [26].

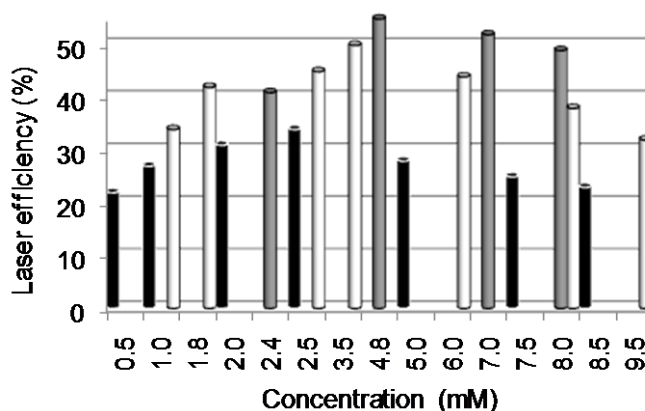


Fig. 2. Lasing efficiencies of the new dyes **1** (black bars), **2** (grey bars) and **3** (white bars) as a function of dye concentration in ethyl acetate solution.

The laser emission spectra of **1** – **3** in solution follow the same dependence on their concentrations, with their laser emission shifted to lower energies as the concentration increases (Fig. 3). This trend must also be related to the effect of re-absorption/re-emission phenomena because the possibility of exciting molecules by absorption of a photon previously emitted by another molecule in the medium depends on the overlapping between absorption and fluorescence spectra, which is affected by the dye concentration [27].

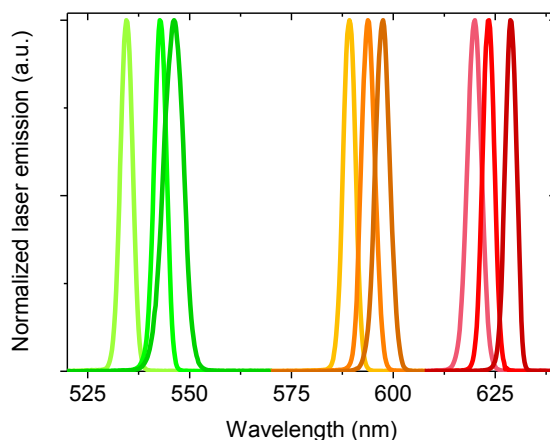


Fig. 3. Lasing emission spectra of the new dyes **1** (green); **2** (orange) and **3** (red) as a function of the dye concentration ( $2 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M and  $8 \times 10^{-4}$  M) in ethyl acetate solution.

The lasing behaviour of the new dyes shows good correlations with their photophysical properties [23] as evidenced by the following observations: 1) the higher the fluorescence quantum yield is, the higher the lasing efficiency becomes; 2) the low fluorescence quantum yield of dye **3** ( $\Phi = 0.48$ ) could, to some extent, be compensated by its high Stokes shift ( $1565 \text{ cm}^{-1}$ ), which reduces the losses at the resonator cavity by re-absorption/re-emission effects, giving rise to high lasing efficiencies, similar to those registered from dye **1** with higher fluorescence quantum yield ( $\Phi = 1$ ); 3) The laser emission of dye **2** shifts up to 56 nm with respect to that of dye **1**, while the presence of (2-methoxyphenyl) substituent at positions 3 and 5 of the BDP core in dye **3** increases this red-shift up to 86 nm.

Solvent effects on the dye laser action were probed by using apolar, polar protic and polar nonprotic media at optimal dye concentrations for the laser efficiencies of each dye (Table 1). We learned from these experiments that the dyes exhibit minimal dependence on solvent

polarities and hydrogen-bonding characteristics; this characteristic represents a great advantage with respect to other pyrromethene derivatives which exhibit stronger environment dependence [14–16,26,28–37].

**Table 1. Laser Parameters<sup>a</sup> of the New BDP Dyes in Different Solvents Pumped at Wavelengths Near Their Absorption Maxima (515 nm for **1** and 532 nm for **2** and **3**), Under Identical Experimental Conditions**

<b>1</b> $2.5 \times 10^{-4}$ M	$\lambda_{\text{exc}} = 515$ nm					
	C'hexane	DCM	AcOEt	acetone	EtOH	MeOH
$\lambda_{\text{laser}}$ (nm)	536	538	532	530	535	534
Eff (%)	21	34	31	29	28	32
<b>2</b> $4.8 \times 10^{-4}$ M	$\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm					
	C'hexane	DCM	AcOEt	acetone	EtOH	MeOH
$\lambda_{\text{laser}}$ (nm)	587	594	590	588	589	586
Eff (%)	45	55	52	51	51	53
<b>3</b> $3.5 \times 10^{-4}$ M	$\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm					
	C'hexane	DCM	AcOEt	acetone	EtOH	MeOH
$\lambda_{\text{laser}}$ (nm)	586	624	616	619	618	619
Eff (%)	47	50	47	49	46	52

<sup>a</sup>  $\lambda_{\text{laser}}$ : peak wavelength of the laser emission, Eff: energy conversion efficiency.

Lasing photostabilities (evolution of the laser-induced emission with the number of pump pulses at 10 Hz) of **1** – **3** in ethyl acetate at concentrations for optimal laser action were recorded (Fig. 4).

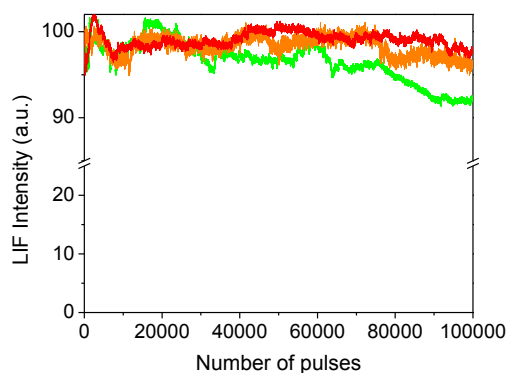


Fig. 4. Normalized laser induced fluorescence emission as a function of the number of pump pulses at 10 Hz repetition rate for **1** ( $2.5 \times 10^{-4}$  M, green), **2** ( $4.8 \times 10^{-4}$  M, orange) and **3** ( $3.5 \times 10^{-4}$  M red) in ethyl acetate.

Dyes **1** - **3** are highly photostable since, after 100000 pump pulses, they maintained their initial emission intensities without any sign of degradation. For instance, the emission intensity of dye **1** drops by less than 10% with respect to its initial output. Thus, the new BDP derivatives are both extremely efficient and photostable at high laser intensities, which should result in an excellent performance when used in fluorescence microscopy. This is particularly so for single-molecule experiments where high photon rates are crucial.

Lasing parameters of three well-known dyes with similar lasing wavelengths were measured in solutions under similar experimental conditions to calibrate the performance of **1** – **3**. The efficiency of Coumarin 540A, ( $1.5 \times 10^{-3}$  M) at ca. 535 nm was 25%, and this fell to 35% after just 30000 pump pulses. Rhodamine 6G ( $4 \times 10^{-4}$  M) lases at 580 nm with an efficiency of 25% but completely losses its emission after 50000 pump pulses. Perylene Red

( $5 \times 10^{-4}$  M) lases at 614 nm with an efficiency of 26% maintaining 70% of its initial emission after 100000 pump pulses. Laser performances exhibited by **1** – **3** are significantly more than those recorded here for the common commercially available BDP dyes (PM567, PM597, and PM650) and their 8-alkyl, 8-phenyl, 8-polyphenylene, 2,6-alkyl or 3-styryl analogues [26,28–30,38–40], pumped under identical experimental conditions. For instance, the laser efficiencies recorded for PM567, PM597 and PM650 in ethyl acetate solutions are 48%, 58% and 20%, respectively, but, with low photostabilities compared with those exhibited by our BDP derivatives, since the commercial BDP dyes lost their initial emission after just 50000, 80000 and 20000 pump pulses, respectively.

### 3.2. Solid state

Solid state experiments were carried out using samples with dye concentrations that had the highest lasing efficiencies in ethyl acetate solutions. MMA (methyl methacrylate) was chosen as the main monomeric component of the formulations because this ester mimics ethyl acetate, a solvent where the studied dyes gave rise to high lasing efficiencies.

Broad-band and efficient laser emission, with beam divergence of ca. 5 mrad and pulse duration of ca. 5 ns FWHM, was registered from the dyes incorporated as true solutions into the solid homopolymer PMMA (Table 2). No significant differences were observed in the wavelength of the maximum laser emission of each dye between their liquid and solid solutions (Fig. 5). The lasing efficiencies of the solid materials, in the range of 25-45%, are lower than those of the corresponding liquid solutions. Surface finishings of the solid samples in these experiments were not laser-grade, and higher lasing efficiencies are expected with laser-grade surfaces. The lasing stabilities of the dye-doped solid matrices were studied by following the evolution of the laser output as a function of the number of pump pulses in the same position of the sample, at 10 Hz repetition rate. Dyes **1** – **3** exhibited high photostabilities, following with the structure a similar dependence to that described in liquid phase.

**Table 2. Laser Properties<sup>a</sup> of **1** - **3** in PMMA and Pumped Near Their Maxima Absorption Wavelength (515 nm for **1** and 532 nm for **2** and **3**), Under Otherwise Identical Experimental Conditions**

Dye/PMMA	[Dye] (M)	Eff (%)	$\lambda_{\text{laser}}$ (nm)	I (%)
<b>1</b>	$2.5 \times 10^{-4}$	25	530	90
<b>2</b>	$4.8 \times 10^{-4}$	45	585	100
<b>3</b>	$3.5 \times 10^{-4}$	32	615	100

<sup>a</sup>Eff: energy conversion efficiency,  $\lambda_{\text{laser}}$ : peak wavelength of the laser emission, I: Intensity of the dye laser output after 100000 pump pulses in the same position of the sample referred to the initial intensity  $I_0$ ,  $I_n(\%) = (I_n/I_0) \times 100$ , at 10 Hz repetition rate.

The laser action of these BDP derivatives doped PMMA improves the lasing properties of commercial BDP dyes PM567, PM597 and PM650 incorporated to PMMA, which exhibited lasing efficiencies of 28%, 40% and 13%, respectively, with lower photostabilities than those reported for these dyes in liquid phase.

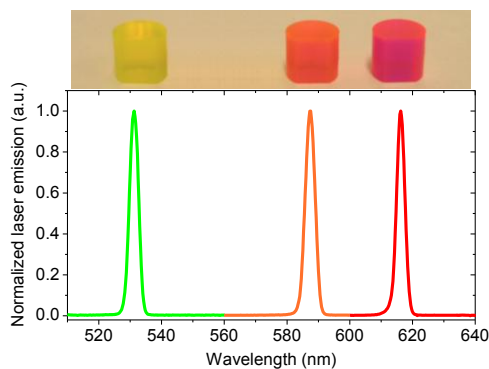


Fig. 5. New photosensitized materials based on the new dyes incorporated into PMMA.

In summary, the BDP dyes studied here lase with high efficiencies, up to 55% in the liquid phase and 45% when incorporated into solid-state matrices. They possess high photostabilities and their laser emissions remain at the initial value without sign of degradation or, in the worst case, less than 10% loss from of their initial value after 100000 pump pulses at 10 Hz repetition rate in the same position of the sample. The position of the emission band was modulated by the type of substituent attached to the BDP core, while maintaining a high laser performance. The new dyes outperform commercial dyes emitting in the same spectral region, being versatile and efficient as active media in dye lasers both in liquid phase and incorporated into solid matrices. Furthermore, the high efficiency and high photostability recorded under drastic laser pumping conditions suggest that these dyes could perform outstandingly well in biophotonic applications, such as optical microscopy and nanoscopy, since serving as fluorescent markers would allow very long observation times and improved spatial resolution.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Spanish MICINN (Projects MAT2010-20646-C04-01 and TRACE2009-0144), and by the National Institutes of Health (GM0879811) and The Robert Welch Foundation (A-1121). V. Martín and M. E. Pérez-Ojeda thank CSIC for her JAE postdoctoral contract and predoctoral grant, respectively.



# New 8-Amino-BODIPY Derivatives: Surpassing Laser Dyes at Blue-Edge Wavelengths

Jorge Bañuelos,<sup>\*,[a]</sup> Virginia Martín,<sup>\*,[b]</sup> C. F. Azael Gómez-Durán,<sup>[c]</sup>  
Ismael J. Arroyo Córdoba,<sup>[c]</sup> Eduardo Peña-Cabrera,<sup>[c]</sup> Inmaculada García-Moreno,<sup>[b]</sup>  
Ángel Costela,<sup>[b]</sup> M. Eugenia Pérez-Ojeda,<sup>[b]</sup> Teresa Arbeloa,<sup>[a]</sup> and  
Íñigo López Arbeloa<sup>[a]</sup>

**Abstract:** The development of highly efficient and stable blue-emitting dyes to overcome some of the most important shortcomings of available chromophores is of great technological importance for modern optical, analytical, electronic, and biological applications. Here, we report the design, synthesis and characterization of new tailor-made BODIPY dyes with efficient absorption and emission in the blue spectral region. The major challenge is the effective management of the electron-donor strength of the substitution pattern, in order to modulate the emission of these novel dyes over a wide spectral range (430–500 nm). A direct relationship between the electron-donor

character of the substituent and the extension of the spectral hypsochromic shift is seen through the energy increase of the LUMO state. However, when the electron-donor character of the substituent is high enough, an intramolecular charge-transfer process appears to decrease the fluorescence ability of these dyes, especially in polar media. Some of the reported novel BODIPY dyes provide very high fluorescence quantum yields, close to unity, and large Stokes shifts, leading to

**Keywords:** BODIPY • charge transfer • dyes/pigments • lasers • photophysics

highly efficient tunable dye lasers in the blue part of the spectrum; this so far remains an unexploited region with BODIPYs. In fact, under demanding transversal pumping conditions, the new dyes lase with unexpectedly high lasing efficiencies of up to 63 %, and also show high photostabilities, outperforming the laser action of other dyes considered as benchmarks in the same spectral region. Considering the easy synthetic protocol and the wide variety of possible substituents, we are confident that this strategy could be successfully extended for the development of efficient blue-edge emitting materials and devices, impelling biophotonic and optoelectronic applications.

## Introduction

The need for the synthesis and development of efficient blue-light-emitting materials and devices is a driving force

in the search for new highly efficient and photostable blue laser dyes, the applications of which would extend beyond data storage and displays.<sup>[1]</sup> Blue laser dyes would be especially important in chemical and biological research, and would have an impact in applications such as microscopy, underwater communications, remote sensing, and photo/electroluminescent devices.<sup>[2]</sup>

There are many blue-emitting laser dyes presently available,<sup>[3]</sup> but unfortunately they suffer from low efficiency, rapid chemical photobleaching (coumarins), and low solubility in most common solvents, including water.<sup>[4]</sup> On the other hand, BODIPY dyes have been demonstrated to provide efficient and stable laser operation in the yellow/red spectral region. Thus, the question arises as to whether it would be possible to extend the operation of these dyes towards the blue region of the spectrum in order to achieve tunable laser emission in this spectral region with improved efficiency and stability. If this were the case, tunable laser emission covering the whole visible spectrum could be obtained by using organic structures with the same core, and simply changing the substituents. Recently, we demonstrated that some of the shortcomings mentioned above are overcome by a newly designed blue-emitting BODIPY such as

[a] Dr. J. Bañuelos, Dr. T. Arbeloa, Prof. Í. L. Arbeloa  
Departamento de Química Física  
Universidad del País Vasco/EHU, Aptdo. 644  
48080 Bilbao (Spain)  
Fax: (+34) 94-601-35-00-34  
E-mail: jorge.banuelos@ehu.es

[b] Dr. V. Martín, Dr. I. García-Moreno, Prof. Á. Costela,  
M. E. Pérez-Ojeda  
Sistemas de Baja Dimensionalidad  
Superficies y Materia Condensada  
Instituto de Química-Física “Rocasolano”, CSIC  
Serrano 119, 28006 Madrid (Spain)  
Fax: (+34) 91-564-24-31  
E-mail: vmartin@iqfr.csic.es

[c] C. F. A. Gómez-Durán, I. J. A. Córdoba, Prof. E. Peña-Cabrera  
Departamento de Química  
Universidad de Guanajuato, Col. Noria Alta S/N  
Guanajuato, Gto. 36050 (Mexico)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201003689>.

8-propargylamino-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (8-PAB) (Figure 1).<sup>[5]</sup> Unlike any other blue-emitting BODIPY structures hitherto described in the literature,<sup>[6]</sup> 8-PAB displays efficient emission with a fluorescence quan-

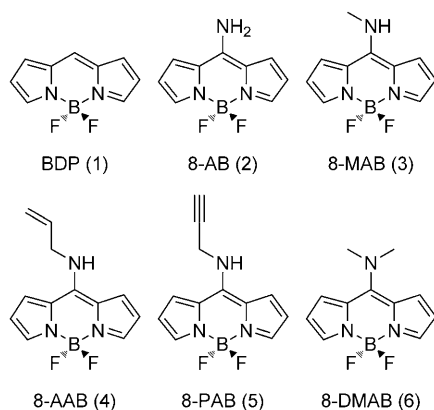


Figure 1. Molecular structure of the new 8-amino-substituted BODIPY dyes.

tum yield up to 94% and high laser efficiency (32%) at the 483 nm emission wavelength under transversal pumping at 355 nm. These results proved that simply by functionalizing the core of the fully unsubstituted BODIPY (BDP, Figure 1) in the “sensitive” 8-position, its emission wavelength is shifted to the blue region, but the quantum yield remains fairly high. This behavior is in contrast to that of previously synthesized 8-anilino derivatives, which exhibited red-shifted emission and low fluorescence quantum yields.<sup>[7]</sup> Likewise, substitution with an amino group at the 3-position decreases the fluorescence emission,<sup>[8]</sup> and consequently, no laser action is exhibited even under drastic pumping conditions.<sup>[8c]</sup> In addition to, and in spite of, the electron-donating character of the amino group, the fluorescence band of this 3-amino-BODIPY<sup>[8c]</sup> peaked at 530 nm, remaining nonshifted with respect to its alkyl-substituted analogue.<sup>[9]</sup>

Different approaches have been attempted to shift the emission wavelength of BODIPY-based chromophores towards lower<sup>[10,11c,d]</sup> and higher<sup>[11]</sup> energies. Here, we make use of the unique properties of the BDP<sup>[12]</sup> and 8-PAB laser dyes to propose a relatively facile method for tuning their active spectra into the blue wavelength region. To this end, we have designed and synthesized new blue-emitting dyes (analogues of fully unsubstituted BODIPY), bearing different amino groups at the 8-position, from primary to tertiary amines (Figure 1). In this way, the donor/acceptor character of the substituent is modified in a controlled manner, and consequently, the photophysical and optical properties of the new dyes are modulated. It is known that the BODIPY dyes substituted with strongly electron-donating groups such as amines are sensitive to the polarity of solvents, leading to low fluorescence quantum yields in polar solvents as a consequence of intramolecular electron transfer.<sup>[13]</sup> Thus, we proceeded to carry out a systematic characterization of

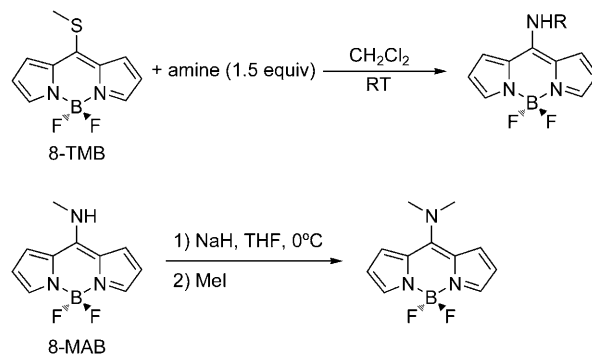
these new 8-amino BODIPY chromophores, and to study in detail the dependence of their emitting properties on the electron-transfer processes, relating their sensitivity to the nature and properties of the media in order to enhance their practical applications.

## Results and Discussion

**Synthesis:** The following compounds were prepared according to literature procedures: 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BDP),<sup>[12]</sup> 8-thiomethyl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (8-TMB),<sup>[14]</sup> and 8-propargylamino-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (8-PAB)<sup>[5]</sup> (Figure 1). The remaining dyes (Figure 1) were prepared according to Table 1 starting from 8-TMB or 8-MAB (Scheme 1).<sup>[14]</sup>

Table 1. Synthesis of new 8-amino-BODIPY dyes.

Product	Amine (or amine equivalent)	Reaction time [min]	Yield [%]
8-AB	NH <sub>4</sub> (OAc)	120	91
8-MAB	methylamine	50	91
8-AAB	allylamine	60	90
8-DMAB	–	120	95



Scheme 1. Synthesis procedure to obtain the new 8-amino BODIPYs.

**Photophysical properties:** BODIPY dyes bearing amino groups at the *meso*-position give rise to spectral bands in the blue part of the visible spectrum, as illustrated in Figure 2.

The electron pair localized at the amine should be susceptible to delocalization onto the BODIPY core, and as consequence, a red shift due to the resonant effect should be expected. However, in the present case the spectral bands are, surprisingly, largely hypsochromically shifted (up to 100 nm) with respect to the unsubstituted BDP dye. Theoretical simulation also predicts a large hypsochromic shift of the spectral bands with the presence of the amine groups. Regardless of the nature of the amine group, in all cases the theoretical simulations identify the spectral bands with a transition between the HOMO and LUMO states, without any interference of lower occupied or higher virtual molecular orbitals. Therefore, the evolution of the energy of these frontier orbitals with the type of amine attached to the



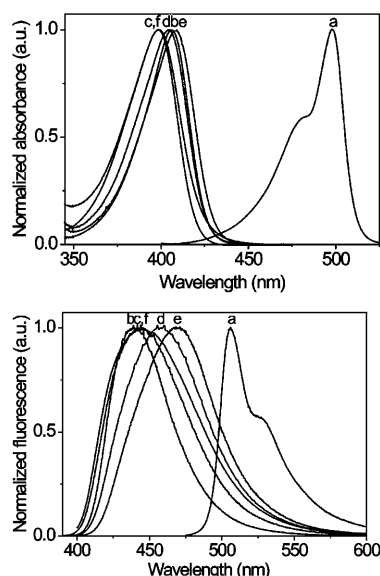


Figure 2. Normalized absorption and fluorescence spectra of a) BDP and its amino derivatives: b) 8-AB, c) 8-MAB, d) 8-AAB, e) 8-PAB, and f) 8-DMAB in methanol.

BODIPY core can be used to explain the spectral blue shift. Indeed, quantum mechanical calculations suggest that the spectral shift is due to an increase of the energy of the

LUMO state, while the HOMO energy remained unaltered (Figure 3). Previous work has shown that the 8-position of the BODIPY core is very sensitive to the substituent effect.<sup>[15]</sup> In fact, the electronic density in this position drastically increases on going from the HOMO to the LUMO state. The amine group is characterized by electron-donating character, as reflected by its value on the Hammett scale ( $\sigma$ ) accounting for the inductive field and resonant effects. Among the different Hammett parameters proposed we chose  $\sigma_{p+}$ , as it is better suited to describing a substituent effect in systems where a positive charge is delocalized through the aromatic framework,<sup>[16]</sup> as is the case in BODIPY dyes. Thus, the presence of such an electron-donor amine group at the *meso*-position induces a net destabilization of the LUMO state because of its high electronic density at that position, as revealed by the energies of the frontier orbitals.

In a previous publication, we observed that the presence of an amine group at the 3-position of the BODIPY core did not affect the positions of the spectral bands.<sup>[9]</sup> The corresponding HOMO and LUMO contour maps show similar electronic density at the 3-position (Figure 3). Therefore, both states are equally affected by the amine group, and the energy gap remains unaltered. Moreover, the presence of an electron-withdrawing substituent such as a cyano group at the *meso*-position leads to a large bathochromic shift of the

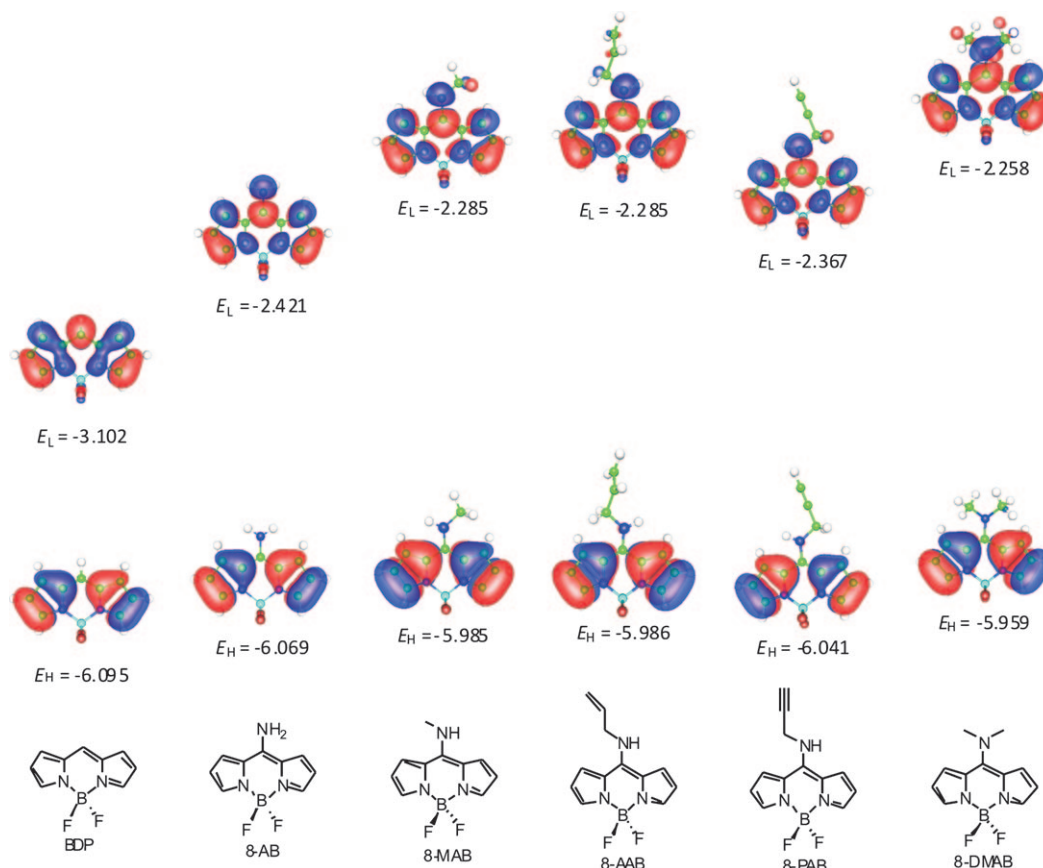


Figure 3. Electronic density and energy (eV) of the HOMO and LUMO states of the 8-aminoBODIPYs, taking the BDP chromophore as reference.

spectral bands.<sup>[17]</sup> In this case, the electron-removal effect of the cyano group induces a net stabilization of the LUMO orbital, relaxing the high electronic density at the 8-position, which in turn leads to a decrease in the energy of the LUMO state and consequently of the energy gap. All these results highlight the importance of both the electronic character of the substituents and the position of their attachment to the BODIPY core. Thus, the appropriate selection of the substituent (electron-donating or electron-withdrawing, controlled by the Hammett parameter) and its position on the BODIPY core (based on the change of the electronic density between the HOMO and LUMO states) allows us to obtain blue- or red-shifted spectral bands with different displacements. In this way, the position of the spectral bands can be modulated, covering nearly the whole visible spectrum with the same laser dye family.

The blue shift obtained with these 8-amino-BODIPYs can also be interpreted in terms of the resonant structures depicted in Figure 4.<sup>[5]</sup> The presence of the amino group

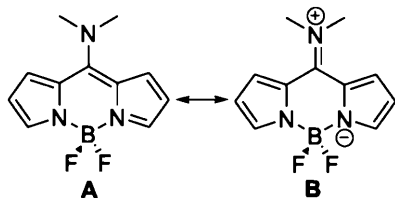


Figure 4. Main resonant structures of the 8-amino-BODIPYs.

should imply a rearrangement of the chromophoric  $\pi$ -system of the BODIPY core, which would acquire a higher statistical weight for the resonant structure B (as long as there are no steric constraints preventing the amino moiety from adopting the coplanar conformation), characterized by its splitting into two entities: the pyrrole ring and the amino-methylenepyrrole system. The electronic density of structure B is localized on the pyrroles and would be responsible for the hypsochromic shift, and therefore, it should prevail in the ground state. In fact, the pyrrole group shows an ultraviolet absorption band centered at 210 nm. On the other hand, its electronic excitation leads to an increase of the negative charge on the amino group (Mulliken charges from  $-0.8$  to  $-1.0$ ), suggesting that the resonant structure A has a higher statistical weight in the excited state. The theoretical C–N bond length increases upon excitation (from 1.356 to 1.371), which indicates a decrease in the bond order and confirms that structure A is more important in the excited state. These features also explain the higher hypsochromic shift of the absorption band with respect to the fluorescence spectrum. Consequently, all the new amino-BODIPYs are characterized by high Stokes shifts ( $2000$ – $4000\text{ cm}^{-1}$ ), which is a desirable property for improving the emission efficiency of laser dyes by decreasing the re-absorption and re-emission phenomena.

Although the above arguments explain the optical properties of the new amino derivatives well, the presence of the

two resonance forms opens the discussion of the real nature of the BODIPY chromophores, as they could be considered to be cyanine-like chromophoric systems, in which case they should be more appropriately called boradipyrromethene-cyanines.<sup>[14,18]</sup> As has been described previously, these hemicyanine dyes are mainly characterized by two electronic transitions, with the long-wavelength one being polymethinic, and the short-wavelength one being localized in the borondipyrromethene moiety. Our *meso*-amino derivatives exhibit a single band in their absorption spectra, much more like the BODIPY nucleus than the hemicyanine dyes. However, the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of the 8-PAB derivative depends strongly on the environment.<sup>[5]</sup> Both in  $\text{CD}_3\text{CN}$  and  $[\text{D}_6]\text{acetone}$  (polar solvents are capable of stabilizing the more polar rotamer B, with a hemicyanine-like delocalized system) it displays seven broad bands in the aromatic region, which may be assigned to the six non-equivalent BODIPY protons plus the NH proton. On the other hand, in  $\text{CDCl}_3$  (a less polar solvent which would not stabilize rotamer B as much), the typical averaged pattern of a symmetrical BODIPY is observed, i.e., three sharper signals corresponding to the pyrrole fragments plus the NH proton resulting from a rapidly rotating amino group. In addition, the photophysical properties of the new dyes depend on the nature of the solvents following a pattern closely related to those of hemicyanine derivatives. With the aim of gaining more insight into the behavior of these new substituted BODIPY systems in order to clarify their nature, and consequently, to decide which nomenclature should be used to name them, the work currently in progress is directed toward the synthesis and structural and optical characterization of other *meso*-amino-substituted BODIPY compounds as a function of the solvent properties.

Table 2 summarizes the main photophysical data of the novel 8-amino-BODIPYs in two solvents of different polarities (all the data and the results obtained in other solvents are listed in Table 2 of the Supporting Information). These

Table 2. Photophysical data of BDP dye and its amino derivatives in ethyl acetate and methanol; absorption ( $\lambda_{\text{abs}}$ ) and fluorescence wavelength ( $\lambda_{\text{fl}}$ ), molar absorption ( $\epsilon_{\text{max}}$ ) and oscillator strength ( $f$ ), fluorescence quantum yield ( $\phi$ ), Stokes shift ( $\Delta\nu_{\text{st}}$ ) and lifetime ( $\tau$ ).

	$\lambda_{\text{abs}}$ [nm]	$\epsilon_{\text{max}}$ ( $f$ ) [ $10^4\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ]	$\lambda_{\text{fl}}$ [nm]	$\phi$	$\Delta\nu_{\text{st}}$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	$\tau$ [ns]
ethyl acetate						
BDP	498.0	5.9 (0.38)	507.5	0.93	376	6.90
8-AB	406.0	2.9 (0.27)	444.0	1.00	2108	4.25
8-MAB	398.5	3.1 (0.34)	444.5	0.42	2597	2.04
8-AAB	405.0	3.0 (0.32)	459.5	0.72	2928	3.59
8-PAB	408.5	3.3 (0.35)	469.5	0.94	3180	5.13
8-DMAB	399.0	2.9 (0.35)	444.5	0.27	2565	1.95
methanol						
BDP	497.0	5.8 (0.39)	507.0	0.87	397	7.33
8-AB	399.0	2.6 (0.26)	437.5	0.92	2205	4.39
8-MAB	394.5	3.0 (0.33)	440.0	0.10	2621	0.52 <sup>[a]</sup>
8-AAB	401.0	2.9 (0.31)	453.0	0.19	2863	0.54 <sup>[a]</sup>
8-PAB	405.0	3.3 (0.35)	464.5	0.52	3163	3.22
8-DMAB	395.8	2.7 (0.32)	438.0	0.09	2434	0.50 <sup>[a]</sup>

[a] Main component of the biexponential fit.

amino derivatives have poor solubility in apolar media but are soluble in water (at least at low concentrations), a solvent in which BODIPYs are not commonly dissolved. This fact could be related to an increase of the dipole moment induced by the amino group. The spectral bands of the amino-BODIPYs are wider, and exhibit lower vibrational resolution, than those of the fully unsubstituted BODIPY (Figure 2), probably because of the above-mentioned rearrangement of the aromatic  $\pi$ -system. Indeed, in all amino-BODIPYs the molar absorption coefficients are lower, although the oscillator strengths are similar to those recorded for BDP (Table 2). The excitation and fluorescence spectra are independent of the emission and excitation wavelength, respectively, indicating that there is only one emitting entity. Because the influence of the electron-donor strength of the amine substituent is an important parameter to take into account, we will focus on the effect of the amine-group substitution pattern on the photophysics of the BODIPY core.

**Primary amine (8-AB):** The presence of the electron-donor amine group ( $\sigma_{\text{p}+} = -1.30$ ) induces an important hypsochromic shift of the spectral bands, mostly seen in the absorption spectrum. In spite of its lower absorption probability, this dye is characterized by a very high fluorescence quantum yield ( $\approx 0.90$ – $1.0$ ) in all the evaluated media (Table 2). The hypsochromic spectral shift of 8-AB is more sensitive to solvent properties than that observed for normal alkyl-BODIPYs;<sup>[19]</sup> this is probably related to specific interactions such as hydrogen bonds between the electron lone pair of the amine group and the solvents. Considering all these features, it can be concluded that the 8-AB dye is highly suitable for use as the active media of novel blue-emitting tunable dye lasers.

**Secondary amines (8-MAB, 8-AAB, and 8-PAB):** In this case, the amines incorporated at the BODIPY core are monosubstituted by alkyl groups. Indeed, methylation (8-MAB) increases the electron-donor capacity of the amine group ( $\sigma_{\text{p}+} = -1.81$ ), which leads to a higher instability of the LUMO orbital, in turn increasing the energy gap and hence the hypsochromic shift of the absorption band (Figures 2 and 3). Besides the reduction of the absorption probability ( $\epsilon \approx 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), a decrease of the fluorescence capacity of 8-MAB is observed (even clearer in polar media,  $\phi \approx 0.15$ ), which is due to a drastic enhancement of the non-radiative deactivation processes (Table 2 in the Supporting Information). Moreover, Figure 5 shows that in more polar solvents the fluorescence decay curve cannot be analyzed further as a monoexponential function, and a second component is needed for an adequate fit. The main decay is characterized by a short lifetime (500–700 ps), and the minor decay by a long lifetime ( $\approx 4$  ns), which is similar to the typical decay of BODIPY. Taking into account these features observed experimentally, and the fact that methylation increases the electron-donor ability of the amine, it is probable that a nonfluorescent intramolecular charge-transfer (ICT) takes place. As no new absorption bands are ob-

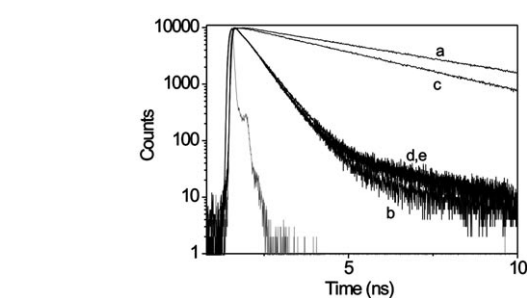


Figure 5. Fluorescence decay curves in methanol of the 8-amino-BODIPYs: a) 8-AB, b) 8-MAB, c) 8-AAB, d) 8-PAB, and e) 8-DMAB.

served at lower energies, such an ICT state should be populated from the locally excited state (LE), efficiently quenching the fluorescence emission, particularly in polar media, in which the ICT state is further stabilized. Besides, no new emission bands are detected at lower energies, indicating that this ICT state is nonfluorescent. Indeed, the dependence of the photophysics of the dye on the acidity of the media seems to confirm this hypothesis: in acid media, like 2,2,2-trifluoro-ethanol (Taft's polarity scale  $\pi^* = 0.73$  and acidity scale  $\alpha = 1.51$ ), the fluorescence quantum yield ( $\phi = 0.23$ ) and lifetime ( $\tau = 1.42$  ns) increase with respect to the values recorded in other polar solvents like water ( $\pi^* = 1.09$  and  $\alpha = 1.17$ ,  $\phi = 0.06$  and  $\tau = 0.28$  ns). The protonation of the amine group decreases the electron-donor character of the amine and hence the formation of the ICT state.

On the other hand, allyl (8-AAB) and propargyl (8-PAB) groups have also been included in the amine group. The expected blue shift of the absorption band was also observed with respect to the fully unsubstituted BDP dye, but in lower extension than that registered for the 8-MAB dye. In fact, the blue shift follows the sequence:  $\lambda(8\text{-MAB}) < \lambda(8\text{-AAB}) < \lambda(8\text{-PAB})$  (Figure 2). Moreover, the fluorescence capacity follows the reverse order, with 8-PAB being the best dye and 8-MAB the worst. The double bond of the allyl, as well as the triple bond of the propargyl, is too far away from the BODIPY core to interact through resonance. Such unsaturation modifies the electron-donor character of the amine, which is decreased with the allyl moiety, and becomes even lower with the propargyl group, compared to the methyl one. Therefore, there should be a direct relationship between the electron-donor capacity of the amine and the extent of the blue shift of the spectral bands. Previously, the blue spectral shift was explained on the basis of the destabilization of the LUMO state by the electron-releasing effect of the amine substituent. Thus, amines with different electron-donor strengths should increase the LUMO energy to a different extent, thus modulating the increase in the energy gap. Moreover, such electron-donor ability is closely related to the formation of the ICT state, and hence to the fluorescence capacity of the dye. To sum up, the higher the electron-donor capacity of the amine substituent, the higher the spectral hypsochromic shift, but the lower the fluorescence ability, because of the formation of the quenching ICT state. The dependence of the fluorescence ability on

both the amine-group substitution pattern and the solvent polarity confirms the presence of the ICT state, the formation and stabilization of which should control the lasing performance of these amino-substituted BODIPYs. Indeed, apolar media, which reduce the probability of fluorescence quenching through this ICT process, are the most recommended environments for the optimization of the lasing action.

**Tertiary amine (8-DMAB):** On first glance, it should be expected that the amine derivative bearing two methyl groups would induce a longer blue shift of the spectral bands than that observed for all the above-mentioned amino-BODIPYs. However, the Hammett parameter for the dimethylamine group ( $\sigma_{p+} = -1.70$ ) is similar to that of the monomethylated one ( $\sigma_{p+} = -1.81$ ). Experimental findings correlate well with these parameters. Indeed, the spectral blue shift for 8-DMAB dye is similar to that induced for the 8-MAB derivative (Figure 2). The fluorescence quantum yield and lifetime are similar for both dyes, indicating that the probability of formation of the ICT state is nearly the same (Table 2). Therefore, both methylated dyes (8-MAB and 8-DMAB) absorb and emit deeper in the blue region of the visible spectrum, but with lower fluorescence efficiency, which could reduce their potential laser action.

More evidence that the ICT process is responsible for the optical properties exhibited by these new 8-amino BODIPY derivatives is provided by the ionization potentials of the amino substituents, which account for their electron-releasing abilities. Although some of these ionization potential values can be extracted from the literature, we calculated all of them theoretically (see Table 2 in the Supporting Information) in order to carry out a proper comparison with the trend suggested by the Hammett parameters. The probability of the presence of an ICT process is expected to increase as the ionization potential of the amino substituent decreases. In accordance with the calculated data, the ionization potentials follow the order  $\text{NMe}_2 < \text{NHMe} < \text{NHCH}_2\text{CHCH}_2 < \text{NHCH}_2\text{CCH} < \text{NH}_2$ , which is the same as the order in which the fluorescence quantum yields of the new dyes decrease. Likewise, other related macromolecular properties such as the ionization potential of the new dyes (obtained from the energies of their HOMO orbitals, Figure 3) and the dipolar moments in both the ground and excited states (calculated theoretically, Table 2 in the Supporting Information) show that, although varying only slightly with the amino substitution, the same trend as described above is followed. Consequently, the discussion of the optical properties of the new dyes from the ionization potentials confirms the behavior suggested by the Hammett parameter about the amino-group effect in both the band positions, and the probability of formation of the intramolecular charge-transfer state.

**Lasing properties:** As the new BODIPY derivatives emit in the blue spectral region, their laser properties were initially analyzed by pumping at the usual wavelength of 355 nm. Under transversal excitation, the dye samples require an op-

tical density of  $\approx 20$  to ensure that the incoming pump radiation penetrates the sample (i.e., is absorbed) by a depth similar to that of the thickness of the pump stripe at the input face of the cell onto which the pumping radiation is focused (about 0.3 mm). This gives rise to an emitted beam with near-circular cross-section, and enhances the laser efficiency (the ratio between the energy of the dye laser output and the energy of the pump laser incident on the sample surface). The low absorption of the new dyes at 355 nm demanded the preparation of highly concentrated solutions in order to reach the required optical density. Although this can result in solubility problems and/or aggregation of dye molecules, which prevents or decreases the laser action, some of the new blue dyes exhibit unexpectedly good lasing properties (Figure 6, top). Under these experimental condi-

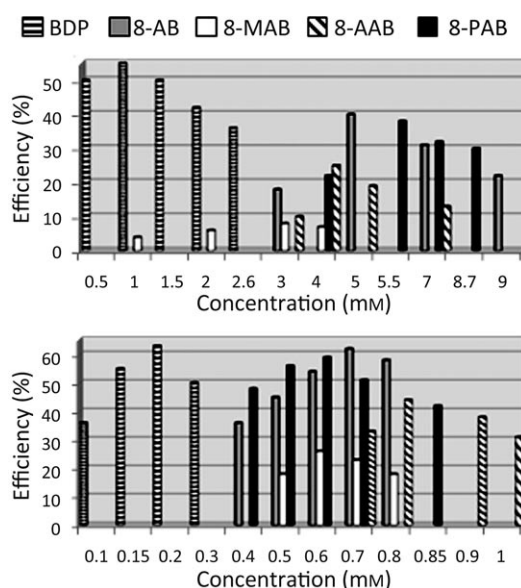


Figure 6. Dependence of the lasing efficiencies of the new 8-amino-BODIPY dyes on their concentration in ethyl acetate solutions pumped at 355 (top) and 400 nm (bottom). For comparison purposes, the corresponding data for the fully unsubstituted BDP dye pumped at 355 (top) and 500 nm (bottom) under otherwise identical experimental conditions are included.

tions, broad-line-width laser emission with a pump threshold energy of  $\approx 0.8$  mJ, a beam divergence of  $\approx 5$  mrad, and a pulse duration of  $\approx 10$  ns FWHM was obtained from the new dyes when they were placed in a simple plane–plane nontunable resonator. The dependence of the laser action of the new BODIPY derivatives on the corresponding dye concentrations was analyzed in ethyl acetate by varying the optical densities while keeping all the other experimental parameters constant. With the exception of the tertiary-amine-substituted dye 8-DMAB, the new dyes lase with efficiencies ranging from 8% (8-MAB derivative) up to 40% (dye 8-AB) (Figure 6 bottom).

The above lasing efficiencies are comparable to or much higher than those obtained with current blue-emitting dyes under similar pumping arrangements. These efficiencies are

even higher when the new dyes are pumped with radiation at a wavelength near to the absorption maximum of each dye: 500 nm for the BDP derivative and 400 nm for the 8-amine-substituted BODIPYs. The lasing behavior of the new dyes (Figure 6, bottom, and Figure 7) shows good corre-

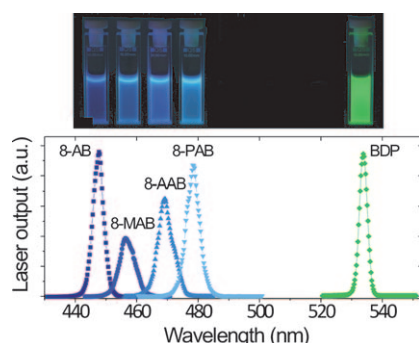


Figure 7. Lasing emission spectra of the new 8-amino-substituted BODIPY dyes transversally pumped at a wavelength near their absorption maxima (400 nm). The intensity of the emission bands is related to the lasing efficiency of each dye. For comparison purposes, the corresponding data for the fully unsubstituted BDP dye pumped at 500 nm under otherwise identical experimental conditions are included.

lation with their photophysical properties in dilute solutions: 1) the 8-DMAB dye, which has the lowest fluorescence quantum yield, does not exhibit laser action even under more drastic pumping conditions; 2) the higher the fluorescence quantum yield and the lower the nonradiative rate constant, the higher the lasing efficiency (up to 63% for BDP and 8-AB); 3) the presence of 8-amine substituents in the BODIPY core blue-shifts the laser emission up to 450 nm, whereas the nonsubstituted BDP dye lases at 535 nm.

The actual effect of the solvent on the dye laser action was analyzed in solutions of polar nonprotic and polar protic solvents at the dye concentrations that optimized the corresponding laser efficiency of each derivative. The low solubility of these new dyes in apolar solvent prevents the concentrated solutions required for laser experiments from being obtained under the pumping conditions selected in the present work. Once again,

the photophysical and laser properties are correlated: the higher the fluorescence quantum yield, the higher the lasing efficiency (Table 3). Thus, these new blue dyes exhibit their highest lasing efficiencies in polar nonprotic solvent such as ethyl acetate.

The lasing photostabilities of the dyes were analyzed in ethyl acetate, and their concentrations were adjusted so that the laser action was optimum in all cases. Although the initial analysis under 355 nm pumping radiation and 1 Hz repetition rate revealed limited photostability,<sup>[5]</sup> once again this lasing parameter was enhanced when the samples were pumped at wavelengths near their absorption maxima, even at the 5 Hz repetition rate (Figure 8). This highly stable laser operation is especially relevant when taking into account previous studies, in which we found that the lasing photostabilities of fluorophores decreased significantly when the pump repetition rate increased, showing that the increase in the local accumulation of heat in the materials impairs their lasing stabilities.<sup>[20]</sup>

According to the photophysical properties, the inclusion of an 8-amine substituent reduces the stability with respect to that exhibited by the unsubstituted BDP dye, with the photostability decreasing according to the substitution pattern of the amine in the order primary > secondary > tertiary

Table 3. Laser parameters<sup>[a]</sup> of the new 8-amino-BODIPY dyes<sup>[b]</sup> in different solvents pumped at 355 nm and 400 nm. For comparison, the corresponding data of the fully unsubstituted BDP dye pumped at 355 nm and 500 nm under otherwise identical experimental conditions are included.

BDP	$\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$				$\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$			
	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH
$\lambda_{\text{laser}} [\text{nm}]$	537	538	538	536	534	533	533	533
Eff [%]	55	31	48	42	63	36	52	47
In [%] [n]	85 [40000]				98 [100000]			
8-AB	$\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$				$\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$			
	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH
$\lambda_{\text{laser}} [\text{nm}]$	456	452	452	450	451	449	448	449
Eff [%]	40	29	25	37	62	52	47	54
In [%] [n]					40 [100000]			
8-MAB	$\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$				$\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$			
	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH
$\lambda_{\text{laser}} [\text{nm}]$	459	457	457	457	457	455	455	455
Eff [%]	8	5	6	4	26	17	14	8
In [%] [n]	20 [18000]				20 [15000]			
8-AAB	$\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$				$\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$			
	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH
$\lambda_{\text{laser}} [\text{nm}]$	473	468	465	463	469	467	464	467
Eff [%]	25	10	4	9	44	24	7	18
In [%] [n]					10 [50000]			
8-PAB	$\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$				$\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$			
	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH	AcOEt	Acetone	EtOH	MeOH
$\lambda_{\text{laser}} [\text{nm}]$	483	477	476	477	479	477	476	477
Eff [%]	32	27	22	20	59	50	41	35
In [%] [n]	20 [18000]				20 [50000]			

[a] Eff: energy conversion efficiency;  $\lambda_{\text{laser}}$ : peak wavelength of the laser emission; In [%]: percent intensity of the laser output after [n] pump pulses, referred to as the initial intensity  $I_0$ ; In (%) =  $(I_0/I_n) \times 100$ . [b] Dye concentrations for pumping at 355 and 400 nm, respectively: 8-AB ( $5 \times 10^{-3} \text{ M}$  and  $7 \times 10^{-4} \text{ M}$ ); 8-MAB ( $3 \times 10^{-3} \text{ M}$  and  $6 \times 10^{-4} \text{ M}$ ); 8-AAB ( $4 \times 10^{-3} \text{ M}$  and  $8 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) and 8-PAB ( $6 \times 10^{-3} \text{ M}$  and  $6 \times 10^{-4} \text{ M}$ ). BDP concentrations for pumping at 355 and 500 nm were  $2 \times 10^{-3} \text{ M}$  and  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ .



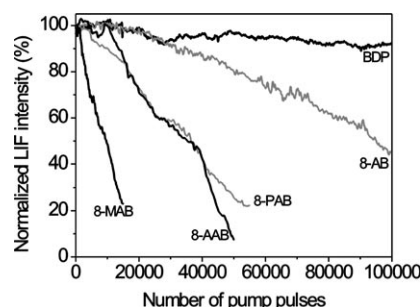


Figure 8. Normalized laser-induced fluorescence emission as a function of the number of pump pulses at 5 Hz repetition rate for the ethyl acetate solutions of the new 8-amino-BODIPY dyes transversally pumped at a wavelength near their absorption maxima. For comparison purposes, the photostability of the fully unsubstituted BDP dye pumped at 500 nm under otherwise identical experimental conditions is also recorded.

amine. In any case, the photobleaching rate of these new blue dyes is significantly slower than that of commercial coumarin dyes pumped under identical experimental conditions.<sup>[5]</sup>

## Conclusion

We have successfully designed and synthesized new BODIPY dyes with particularly useful photophysical properties, which can achieve large spectral blue shifts. The incorporation of amine groups with different electron-donor strengths at the *meso*-position of the BODIPY core, allows the modulation, controlled by the substitution pattern, of the emission of these novel BODIPY dyes over a wide range (440–505 nm) in the blue spectral region. A direct relationship between the electron-donor character of the substituent and the extension of the spectral hypsochromic shift has been found through the energy increase of the LUMO state. However, when the electron-donor character of the amine group is high enough, an ICT quenching process appears, decreasing the fluorescence ability of the blue dyes, especially in polar media. Some of the reported novel blue BODIPY dyes provide very high fluorescence quantum yields close to unity, and large Stokes shifts, leading to highly efficient tunable dye lasers in the blue part of the visible spectrum. So far, this remains an unexploited region with BODIPYs. In fact, under demanding transversal pumping conditions, the new dyes lase with unexpectedly high lasing efficiencies of up to 63 %, and exhibit high photostabilities, which mean that these dyes exceed the lasing properties of commercial dyes with emissions in the same spectral region when pumped under identical experimental conditions. Thus, some of the most important shortcomings of blue-edge dyes can be overcome by these new tailor-made chromophores, impelling their advanced applications.

## Experimental Section

**Materials:** Solvents for laser and photophysical studies were of spectroscopic grade (Merck, Aldrich or Sigma) and were used without purification; those used in synthetic work were purified by standard methods. Other reagents were from commercial sources, and used as received. The commercial laser dyes Stilbene 3 (also called Stilbene 420) and Coumarin 503 (also called Coumarin 307), were used as received with a purity > 99 % (checked by spectroscopic and chromatographic methods).

**Synthesis and characterization:** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Varian Gemini 200 (200 MHz) spectrometer in deuteriochloroform (CDCl<sub>3</sub>), with either tetramethylsilane (TMS) (0.00 ppm <sup>1</sup>H, 0.00 ppm <sup>13</sup>C), chloroform (7.26 ppm <sup>1</sup>H, 77.00 ppm <sup>13</sup>C), [D<sub>3</sub>]acetonitrile (1.94 ppm <sup>1</sup>H, 118.3, 1.3 ppm <sup>13</sup>C), or [D<sub>6</sub>]acetone (2.05 ppm <sup>1</sup>H, 206.0, 29.8 ppm <sup>13</sup>C) as internal reference. Data are reported in the following order: chemical shift in ppm, multiplicities (br (broadened), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), sex (sextet), hep (heptet), m (multiplet), exch (exchangeable), app (apparent)), coupling constants, *J* (Hz), and integration. Infrared spectra were recorded on a Perkin–Elmer FTIR 1600 series spectrophotometer. Peaks are reported (cm<sup>−1</sup>) with the following relative intensities: s (strong, 67–100 %), m (medium, 40–67 %), and w (weak, 20–40 %). Melting points were determined on a Stanford Research Systems EZ-Melt apparatus and are not corrected.

**8-Amino-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (8-AB):** 8-TMB (80 mg, 0.34 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in a 20 mL scintillation vial in a 1:1 v/v H<sub>2</sub>O/MeOH mixture (1 mL), whereupon NH<sub>4</sub>OAc (38 mg, 0.50 mmol, 2.0 equiv) was added. The vial was capped and warmed at 60 °C, and after 2 h the reaction reached completion. The volatiles were removed under reduced pressure, and the product was purified by crystallization (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/petroleum ether) to give a yellow crystalline powder (63 mg, 91 % yield). TLC (30 % EtAcO/hexane *R*<sub>f</sub>=0.1); m.p. 160–162 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =3459 (m), 3369 (s), 3273 (m), 3113 (w), 1659 (s), 1567 (s), 1457 (s), 1401 (s), 1306 (m), 1277 cm<sup>−1</sup> (m); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =7.65 (brs, 2H), 7.11 (brs, 2H), 6.19 (s, 2H), 6.49 ppm (s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$ =150.9, 135.0, 125.3, 119.80, 115.5 ppm; HRMS (FAB): *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>: 208.0857; found: 208.0853.

**8-Methylamino-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (8-MAB):** Under stirring, a 20 mL scintillation vial was charged with 8-TMB (80 mg, 0.34 mmol, 1 equiv) and dichloromethane (2 mL), then methylamine (42  $\mu$ L of a 41 % v/v aq. solution, 0.50 mmol, 1.5 equiv) was added using a syringe. The vial was capped, and after 50 min at room temperature the reactions reached completion. The solvent was removed under vacuum, and the product was purified by crystallization (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/petroleum ether) to give a yellow crystalline powder (67 mg, 91 % yield). TLC (30 % EtAcO/Hexane *R*<sub>f</sub>=0.1); mp 199–201 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =3365 (s), 1603 (s), 1563 (s), 1455 (m), 1389 (s), 1277 (s), 1231 cm<sup>−1</sup> (s); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =7.73 (brs, 1H), 7.5 (brs, 1H), 7.2 (brs, 1H), 6.87 (brs, 2H), 6.56 (brs, 1H), 6.38 (brs, 1H), 3.36 ppm (d, *J*=5.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$ =148.83, 133.37, 130.0, 124.6, 123.34, 121.94, 114.82, 113.81, 112.54, 32.81 ppm; HRMS (FAB): *m/z* calcd for C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>: 222.1014; found: 222.1017.

**8-Allylamino-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (8-AAB):** A 20 mL scintillation vial was charged with 8-TMB (100 mg, 0.42 mmol, 1 equiv), and dichloromethane (2 mL) under stirring, then allylamine (36 mg, 0.63 mmol, 1.5 equiv) was added using a syringe. The vial was capped, and after 60 min at room temperature the reactions reached completion. The solvent was removed under vacuum, and the product was purified by crystallization (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/petroleum ether) to give a yellow crystalline powder (93 mg, 90 % yield). TLC (30 % EtAcO/hexane *R*<sub>f</sub>=0.2); mp 131–132 °C; IR (KBr):  $\tilde{\nu}$ =3390 (s), 2958 (m), 2924 (s), 2854 (m), 2359 (m), 2341 (m), 1592 (s), 1558 (s), 1389 (s), 1337 (s), 1227 cm<sup>−1</sup> (s); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ =7.62 (brs, 2H), 7.05 (brs, 2H), 6.47 (brs, 3H), 6.05 (m, 1H), 5.47 (dd, *J*=16.8, 10.8 Hz, 2H), 4.36 ppm (m, *J*=5.6 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, [D<sub>6</sub>]acetone):  $\delta$ =150.2, 135.3, 132.6, 132.3, 126.3, 124.9, 122.9, 118.3, 116.9, 115.2, 114, 49.9 ppm; HRMS (FAB): *m/z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>: 248.1171; found: 248.1168.

**8-Dimethylamino-4,4-difluoro-4-bora-3,4,4-diaza-s-indacene (8-DMAB):** An oven-dry 10 mL round-bottomed flask was charged under N<sub>2</sub> with a stirrer bar, 8-MAB (95 mg, 0.43 mmol, 1 equiv), and THF (3 mL). The reaction flask was cooled down to 0 °C (ice bath), and NaH (41 mg, 1.7 mmol, 4 equiv) was added. The mixture was stirred at 0 °C for 15 min, whereupon MeI (242 mg, 1.7 mmol, 4 equiv) was added dropwise using a syringe. After 2 h at 0 °C the reaction reached completion. The volatiles were removed under reduced pressure, and the remaining solid was adsorbed in a SiO<sub>2</sub> gel pad. The less polar impurities were removed with a 10 % mixture of EtOAc/Hexane, and the product was eluted with a 30 % mixture of EtOAc/hexane to give a yellow crystalline solid (96 mg, 95 % yield). TLC (30 % EtOAc/Hexane *R<sub>f</sub>* = 0.1); IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3119 (w), 3107 (w), 1572 (m), 1523 (m), 1455 (m), 1394 (s), 1308 (m), 1237 cm<sup>-1</sup> (w); <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.57 (s, 2H), 7.02 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H), 6.44 (m, 2H), 3.68 ppm (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>CN):  $\delta$  = 132.0, 125.7, 124.2, 113.6, 48.9 ppm; HRMS (FAB): *m/z* calcd for C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>3</sub>: 236.1171; found: 236.1174.

**Photophysical properties:** The photophysical properties were registered in diluted solutions (around 2 × 10<sup>-6</sup> M), prepared by adding the corresponding solvent to the residue from an adequate amount of concentrated stock solution in acetone, after vacuum evaporation of this solvent. UV/Vis absorption and fluorescence spectra were recorded on a Varian model CARY 4E spectrophotometer and a SPEX Fluorolog 3–22 spectrofluorimeter, respectively. Fluorescence quantum yields ( $\phi_f$ ) were obtained using an ethanolic solution of Coumarin 1 as reference ( $\phi_f$  = 0.75)<sup>[21]</sup> for the amino derivatives, and PM546 in methanol ( $\phi_f$  = 0.95)<sup>[21]</sup> was used for the BDP chromophore. Radiative decay curves were registered using the time-correlated single-photon counting technique (Edinburgh Instruments, model FL920, with picosecond time resolution). The fluorescence emission was monitored at the maximum emission wavelength after excitation at 370 nm by means of a diode laser (PicoQuant, model LDH470) with 150 ps FWHM pulses. The fluorescence lifetime ( $\tau$ ) was obtained after the deconvolution of the instrumental response signal from the recorded decay curves by means of an iterative method. The goodness of the exponential fit was controlled by statistical parameters (chi-square, Durbin-Watson, and analysis of the residuals). The radiative ( $k_r$ ) and nonradiative ( $k_{nr}$ ) rate constants were calculated from the fluorescence quantum yield and lifetime:  $k_r = \phi_f/\tau$  and  $k_{nr} = (1 - \phi_f)/\tau$ .

**Computational details:** All the quantum mechanical calculations were performed using the Gaussian 03 package. Ground- and excited-state geometries were fully optimized by the density functional theory (DFT) method (using the B3LYP functional) and the configuration interaction singles (CIS) ab initio method, respectively, using the 6-31G basis set. Absorption and fluorescence transitions were simulated by means of the time-dependent DFT (TD-DFT) method from the ground and excited state geometries, respectively.

**Laser experiments:** Liquid solutions of dyes were contained in 1 cm optical-path quartz cells, which were carefully sealed to avoid solvent evaporation during the experiments. The solutions of the newly synthesized dyes were transversely pumped at different wavelengths matching the maximum absorption of the corresponding dyes: at 355 nm, with 5 mJ per pulse, 8 ns FWHM pulses from the third harmonic of a Q-switched Nd:YAG laser (Spectron SL282G), and at 400 nm and 500 nm with 5 mJ per pulse, 12 ns FWHM pulses from a Nd-YAG-pumped dye laser (Spectron SL800 with an ethanolic solution of Stilbene 3 and Coumarin 503, respectively), at a repetition rate of up to 5 Hz. The excitation pulses were line-focused onto the cell, providing pump fluences on the active medium of 110 mJ cm<sup>-2</sup>. The oscillation cavity (2 cm length) consisted of a 90 % reflectivity aluminum mirror, with the lateral face of the cell as the output coupler.

The photostabilities of the dyes were evaluated by irradiating 10  $\mu$ L of a solution in ethyl acetate under lasing conditions. The solutions were contained in cylindrical Pyrex tubes (1 cm height, 1 mm internal diameter), which were carefully sealed to avoid solvent evaporation during the experiments. Although the low optical quality of the capillary tube prevents laser emission from the dyes, information about their photostabilities can be obtained by monitoring the decrease in laser-induced fluorescence intensity, when excited transversally to the capillary tube, as a function of

the number of pump pulses at the 5 Hz repetition rate. The fluorescence emission was monitored perpendicular to the exciting beam, collected by an optical fiber, and imaged onto the input slit of a monochromator (Acton Research corporation), and detected with a charge-coupled device (CCD) (SpectraMM:GS128B). The fluorescence emission was recorded by feeding the signal to the boxcar (Stanford Research, model 250), to be integrated before being digitized and processed by a computer. Each experiment was repeated at least three times. The estimated error in the energy and photostability measurements was 10 %.

## Acknowledgements

The authors thank CONCYTEG, Mexico (Grant GTO-2007-C02-69094), the Spanish MICINN (MAT2010-20646-C04-03, MAT2010-20646-C04-04, and TRACE2009-0144) and Gobierno Vasco (IT339-10) for financial support. C.F.A.G.-D. thanks CONCYTEG for his undergraduate fellowship; and V.M. and M.E.P.-O. thank CSIC for their JAE-postdoctoral and JAE-predocdoctoral contracts, respectively.

- [1] a) M.-S. Schiedel, C. A. Briehn, P. Bäuerle, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4813–4816; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4677–4680; b) R. Mondal, B. K. Shah, D. C. Neckers, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4085–4091; c) Y. Hu, B. Wex, M. W. Perkovic, D. C. Neckers, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2251–2258; d) *Tunable Laser Applications*, 2nd ed. (Ed.: F. J. Duarte), CRC Press, Boca Raton, **2009**; e) A. Pron, G. Zhou, H. Norouzi-Arasi, M. Baumgarten, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3550–3553.
- [2] a) S.-W. Wen, M.-T. Lee, C. H. Chen, *J. Disp. Technol.* **2005**, *1*, 90–99; b) Y. Yan, M. Zhang, K. Gong, L. Su, Z. Guo, L. Mao, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 3457–3563; c) M. Y. Lo, A. Sellinger, *Synlett* **2006**, *18*, 3009–3012; d) Z.-S. Wang, Y. Cui, K. Hara, Y. Dan-oh, C. Kasada, A. Shinpo, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1138–1141; e) T. Z. Yu, P. Zhang, Y. L. Zhao, H. Zhang, J. Meng, D. W. Fan, W. K. Dong, *J. Phys. D* **2008**, *41*, 235406; f) X. Zhan, S. Barlow, S. R. Marder, *Chem. Commun.* **2009**, 1948–1955; g) Y. Matano, H. Imahori, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1258–1271.
- [3] a) *Laser Dyes*, 3rd ed. (Ed.: U. Brackmann), Lambda Physik AG, Göttingen **2000**; b) *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* (Ed.: B. Valeur), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**; c) J. N. Moorthy, P. Natarajan, P. Venkatakrishnan, D.-F. Huang, T. J. Chow, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5215–5218; d) Q.-X. Tong, S.-L. Lai, M.-Y. Chan, Y.-C. Zhou, H.-L. Kwong, C.-S. Lee, S.-T. Lee, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 6310–6312; e) A. Lida, S. Yamaguchi, *Chem. Commun.* **2009**, 3002–3004; f) R. M. Adhikari, D. C. Neckers, B. K. Shah, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3341–3349.
- [4] a) A. N. Fletcher, M. E. Pietrak, *Appl. Phys. B* **1985**, *37*, 151–157; b) A. Costela, I. García-Moreno, R. Sastre in *Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices*, Vol. 7: *Liquid Crystals, Display and Laser Materials* (Ed.: H. S. Nalwa), Academic Press, San Diego, **2001**, Chapter 4, pp. 161–208; c) S. Nad, M. Kumbhakar, H. Pal, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 4808–4816.
- [5] C. F. A. Gómez-Durán, I. García-Moreno, A. Costela, V. Martín, R. Sastre, J. Bañuelos, F. López Arbeloa, I. López Arbeloa, E. Peña Cabrera, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5103–5105.
- [6] a) G. Sathyamoorthi, M.-L. Soong, T. W. Ross, J. H. Boyer, *Heteroat. Chem.* **1993**, *4*, 603–608; b) T. W. Ross, G. Sathyamoorthi, J. H. Boyer, *Heteroat. Chem.* **1993**, *4*, 609–612; c) S.-L. Niu, G. Ulrich, P. Retailleau, J. Harrowfield, R. Ziessel, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 3840–3844.
- [7] a) X. Zhang, H. Wang, J. S. Li, H.-S. Zhang, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *481*, 101–108; b) Y. Gabe, Y. Urano, K. Kikuchi, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3357–3367; c) M. Li, H. Wang, X. Zhang, H.-S. Zhang, *Spectrochim. Acta Part A* **2004**, *60*, 987–993; d) X. Zhang, H.-S. Zhang, *Spectrochim. Acta Part A* **2005**, *61*, 1045–1048; e) E. Lager, J. Liu, A. Aguilar-Aguilar, B. Z. Tang, E. Peña-Cabrera, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2053–2058.

- [8] a) T. Rohand, M. Baruah, W. Qin, N. Boens, W. Dehaen, *Chem. Commun.* **2006**, 266–268; b) M. P. Shandura, V. P. Yakubovskiy, Y. P. Kovtun, *J. Heterocycl. Chem.* **2009**, *46*, 1386–1391; c) M. Liras, J. Bañuelos, M. Pintado-Sierra, F. López Arbeloa, I. García-Moreno, A. Costela, L. Infantes, R. Sastre, F. Amat-Guerri, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4183–4186.
- [9] J. Bañuelos, F. López Arbeloa, T. Arbeloa, S. Salleres, J. L. Vilas, F. Amat-Guerri, M. Liras, I. López Arbeloa, *J. Fluoresc.* **2008**, *18*, 899–907.
- [10] a) T. Okujima, Y. Tomimori, J. Nakamura, H. Yamada, H. Uno, N. Ono, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6895–6900; b) L. J. Jiao, C. J. Yu, T. Uppal, M. M. Liu, Y. Li, Y. Y. Zhou, E. H. Hao, X. K. Xiaoke, M. G. H. Vicente, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2517–2519; c) I. García-Moreno, D. Zhang, A. Costela, V. Martín, R. Sastre, Y. Xiao, *J. Appl. Phys.* **2010**, *107*, 073105; d) O. Buyukcakil, O. A. Bozdemir, S. Kolemen, S. Erbas, E. U. Akkaya, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4644–4647; e) Z. Ekmekci, M. D. Yilmaz, E. U. Akkaya, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 461–464; f) Z. Dost, S. Atilgan, E. U. Akkaya, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8484–8488.
- [11] a) A. Harriman, G. Izzet, R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10868–10875; b) C. Goze, G. Ulrich, R. Ziessel, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 313–322; c) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932; d) G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1202–1219; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184–1201; e) F. E. Alemdaroglu, S. C. Alexander, D. Ji, D. K. Prusty, M. Börsch, A. Hermann, *Macromolecules* **2009**, *42*, 6529–6536.
- [12] I. J. Arroyo, R. Hu, G. Merino, B. Z. Tang, E. Peña Cabrera, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5719–5722.
- [13] K. Rurack, M. Kollmannsberger, J. Daub, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 396–399; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 385–387.
- [14] T. V. Goud, A. Tutar, J.-F. Biellmann, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5084–5091.
- [15] F. López Arbeloa, J. Bañuelos, V. Martínez, T. Arbeloa, I. López Arbeloa, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2005**, *24*, 339–374.
- [16] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165–195.
- [17] F. López Arbeloa, J. Bañuelos, V. Martínez, T. Arbeloa, I. López Arbeloa, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1762–1771.
- [18] a) V. P. Yakubovskiy, M. P. Shandura, Y. P. Kovtun, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3237–3243; b) V. P. Yakubovskiy, M. P. Shandura, Y. P. Kovtun, *Dyes Pigm.* **2010**, *87*, 17–21; c) Y.-W. Wang, A. B. Descalzo, Z. Shen, X.-Z. You, K. Rurack, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 2887–2903.
- [19] a) F. Amat-Guerri, M. Liras, M. L. Carrascoso, R. Sastre, *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 577–584; b) M. Álvarez, F. Amat-Guerri, A. Costela, I. García-Moreno, C. Gómez, M. Liras, R. Sastre, *Appl. Phys. B* **2005**, *80*, 993–1006.
- [20] R. Duchowicz, L. B. Scaffardi, A. Costela, I. García-Moreno, R. Sastre, A. U. Acuña, *Appl. Opt.* **2003**, *42*, 1029–1035.
- [21] F. López Arbeloa, T. López Arbeloa, I. López Arbeloa, in *Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices, Vol. 7: Liquid Crystals, Display and Laser Materials* (Ed.: H. Nalwa), Academic Press, San Diego, **2001**, Chapter 5, pp. 209–245.

Received: December 21, 2010

Published online: May 5, 2011





# Unprecedented solid-state laser action from BODIPY dyes under UV-pumping radiation

M.E. Pérez-Ojeda · V. Martín · A. Costela ·  
I. García-Moreno · I.J. Arroyo Córdoba ·  
E. Peña-Cabrera

Received: 5 July 2011 / Revised version: 2 September 2011 / Published online: 11 October 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Highly efficient and stable laser emission is demonstrated under drastic UV pumping conditions from recently synthesized BODIPY dye incorporated into polymer host. Under transversal pumping at 355 nm, lasing efficiencies of up to 29%, similar to those obtained in liquid phase, were obtained, with useful lifetimes (drop of the emission by 50%) of 70,000 pulses at 5 Hz repetition rate. The obtained efficiency and photostability are much higher than those obtained with usual commercial dyes emitting in the same spectral region, such as Coumarin 540A, under the same experimental conditions.

## 1 Introduction

Solid-state dye lasers (SSDL) show great promise for the development of compact, inexpensive, maintenance-free, hazardless, efficient, and tunable laser sources. To date, progress in host material processing has led to highly efficient and photostable tunable SSDL in the green-red (550–750 nm) spectral region based on polymeric matrices doped with organic dyes [1]. The high photostability demonstrated with these materials ensures long operating lifetimes of the active laser media with output power characteristics being on a par with those obtained in liquid solutions [2–13]. Nevertheless, these SSDL systems only could reach their com-

mercial marketplace in a wide range of applications spanning different fields such as spectroscopy, nonlinear optics, medicine, communication and industry [12, 13], if they offer the same wavelength coverage reached with liquid dye lasers. This means extending the tuning range of SSDLs to the blue-edge spectral region.

The search to extend the remarkable properties of SSDL to lower wavelengths is fundamentally restricted by the inefficiency of the usual laser dyes in this region; furthermore, the UV optical excitation needed to obtain laser emission in the blue and near green regions results in a very fast degradation [14–17]. Recently, some of these shortcomings have been overcome by newly designed BODIPY dyes [18, 19]. Some of these reported novel BODIPYs lase in the blue and near green spectral regions, under demanding transversal pumping conditions and in liquid solution, with unexpectedly high lasing efficiencies and high photostabilities, outperforming the laser action of existing commercial dyes considered as benchmarks in these spectral regions. However, when we tried to incorporate these dyes into polymeric matrices through thermoinduced radical polymerization, a fast dye degradation was observed, due to the reaction with the radicals generated in the system by the initiator fragmentation during the initiation stage.

In this letter, we demonstrate for the first time efficient and stable laser emission, under drastic UV pumping conditions, from a recently synthesized BODIPY dye (8-propyl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, 8-PBDP) incorporated into polymeric hosts.

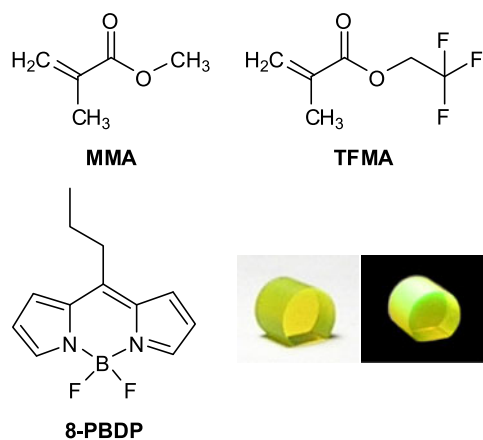
## 2 Experimental part

### 2.1 Materials

Details of the synthesis of the new dye have been reported elsewhere [20]. Commercial laser dyes Pyrromethene 546

M.E. Pérez-Ojeda · V. Martín (✉) · A. Costela · I. García-Moreno  
Departamento de Sistemas de Baja Dimensionalidad, Superficies  
y Materia Condensada, Instituto de Química-Física “Rocasolano”,  
CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain  
e-mail: vmartin@iqfr.csic.es

I.J. Arroyo Córdoba · E. Peña-Cabrera  
Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, Col.  
Noria Alta S/N, Gto. 3605 Guanajuato, Mexico



**Fig. 1** Molecular structures of newly synthesized 8-PBDP dye and the monomers selected in this work. Polymeric solid laser sample based on the new dye doped poly(methyl methacrylate)

(PM546) and Coumarin 540A (C540A) (laser grade, Exciton) were used as received with a purity >99% (checked by spectroscopic and chromatographic methods). Solvents for laser studies were of spectroscopic grade (Merck, Aldrich, or Sigma) and were used without further purification. Linear copolymers were obtained by copolymerization of methyl methacrylate (MMA) with different volumetric proportions of the fluorinated monomer 2,2,2-trifluoroethyl methacrylate (TFMA). Methyl methacrylate (Aldrich) was distilled under reduced pressure before use. The initiator: 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN) (Acros) was also purified by recrystallization in ethanol before use. Figure 1 shows the molecular structures of the new dye and the employed monomers.

## 2.2 Preparation of solid polymeric samples

The synthesis route followed to prepare the materials was radical bulk polymerization of the selected monomers with the adequate amount of dye to achieve the final concentration required in these experiments [16]. The 8-PBDP dye resists well the conditions of radical polymerization *in situ*, which allows optimizing the optical properties of the final material by controlling structure, monomer functionality, dye concentration and sample geometry. In fact, the proper and simultaneous control of these parameters, which results critical to optimize the laser action of dyes in solid media, cannot be achieved incorporating the dye into the polymer through processes such as impregnation or extension and solvent evaporation of polymer solutions containing dyes [21].

The solid monolith laser samples were cast in cylindrical shapes, forming rods of 10 mm diameter and 10 mm length. A cut was made parallel to the axis of the cylinder to obtain a lateral flat surface of ca. 6 mm × 10 mm (Fig. 1). This surface as well as the ends of the laser rods was prepared

for lasing experiments by using a grinding and polishing machine (Phoenix Beta 4000, Buehler) until optical-grade finished. The planar grinding stage was carried out with a P4000 (~6 μm) silicon carbide disk (Tecmicro) as an abrasive with mineral oil as a lubricant. The final polishing stage was realized using a cloth disk Mastertex (Buehler) with diamond of 1 μm in mineral oil as an abrasive type. Details of the polymerization procedure and experimental system can be found elsewhere [8–11, 18–21].

## 2.3 Laser experiments

Liquid solutions of dyes were contained in 1 cm optical-path quartz cells that were carefully sealed to avoid solvent evaporation during experiments. The solutions of the 8-PBDP dye as well as the solid samples doped with it were transversely pumped at 355 nm, with 5.5 mJ/pulse, 10 ns full width at half maximum FWHM pulses from a frequency-tripled Q-switched Nd:YAG laser (Spectron SL282G). The exciting pulses were line-focused onto the cell (or onto the lateral flat surface of the solid sample) providing pump fluences on the active medium of 180 mJ/cm<sup>2</sup>. The oscillation cavity (2 cm length) consisted of a 90% reflectivity aluminum mirror, with the lateral face of the cell (or the end face of the solid sample) as output coupler.

## 3 Results and discussion

As the laser properties depend strongly on both environment conditions and dye concentration, we firstly analyzed the lasing behavior of the 8-PBDP dye in liquid phase under the same experimental conditions selected to pump this dye incorporated into solid matrices. These studies guided the selection, among the quasi-limitless compositions and structures of solid materials, of the best dye/matrix combination to optimize the laser action in terms of both efficiency and stability, simplifying the always complex process of synthesis of these materials. The results and information provided by these previous studies showed that, under the selected pumped conditions,  $3 \times 10^{-3}$  M is the dye concentration that optimizes its lasing efficiency (Eff, defined as the ratio between the energy of the dye laser output and the energy of the pump laser incident on the sample surface), especially when the solvents were ethyl acetate (Eff: 28%) and 2,2,2-trifluoroethanol (Eff: 31%) (Fig. 2).

On the basis of the above considerations, we synthesized as promising host materials 8-PBDP dye doped poly(methyl-methacrylate) (PMMA), which mimics ethyl acetate solvent, and copolymers with different volumetric proportions of monomers MMA and 2-trifluoromethyl methacrylate (TFMA), which mimic the fluorinated solvent.

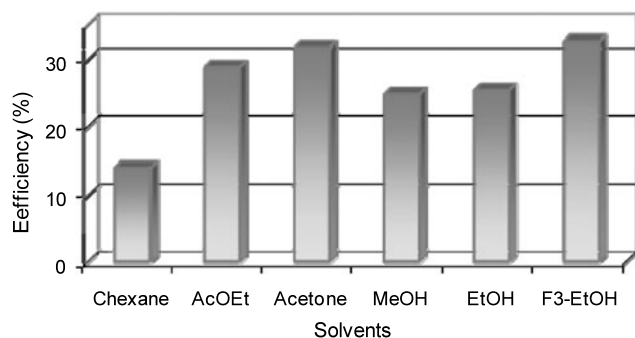
**Table 1** Laser parameters<sup>a</sup> for 8-PBDP dye incorporated in pure PMMA and in fluorinated linear copolymers (v/v proportion). Nd:YAG laser (third harmonic) pump energy: 5.5 mJ/pulse. Dye concentration:  $3 \times 10^{-3}$  M

Material	$\lambda_{\max}$ (nm)	FWHM (nm)	Eff (%)	$I_n$ (%) <sup>b</sup>	$I_n$ (%) <sup>c</sup>
PMMA	523	2.5	28	50 (45,000)	50 (70,000)
COP(MMA-TFMA 9:1)	522	2.8	29	50 (20,000)	50 (40,000)
COP(MMA-TFMA 7:3)	522	3.5	19	50 (4,500)	50 (20,000)

<sup>a</sup>Eff: energy conversion efficiency;  $\lambda_{\max}$ : maximum wavelength of the laser emission; FWHM: full width at half maximum of the laser emission

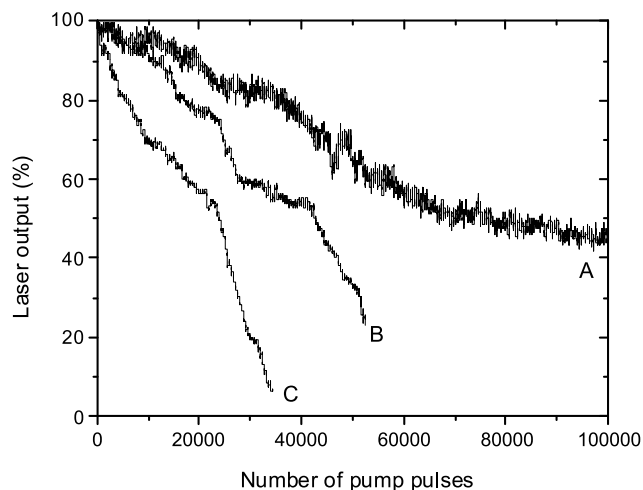
<sup>b</sup>Intensity of the dye laser output after the number of pump pulses indicated between parenthesis, referred to the initial intensity  $I_0$ , at 10 Hz repetition rate:  $I_n(\%) = (I_n/I_0) \times 100$

<sup>c</sup>Repetition rate: 5 Hz

**Fig. 2** Lasing efficiency of the dye 8-PBDP ( $3 \times 10^{-3}$  M) as a function of the solvent

Broad-line-width laser emission peaked at 523 nm with pump threshold energy of  $\sim 0.6$  mJ, beam divergence of  $\sim 5$  mrad, and pulse duration of  $\sim 6$  ns FWHM (full width at half-maximum) was obtained from the materials when placed in a simple plane-plane non tunable resonator. A summary of the results obtained is shown in Table 1, where data on peak and full width at half maximum of the laser emission, lasing efficiency, and laser photostability (with respect to initial intensity) after 70,000 pump pulses in the same position of the sample are included. For the sake of clarity, the evolution of the laser output with the number of pump pulses at 5 Hz repetition rate is graphically shown for different photosensitive materials (Fig. 3).

Lasing efficiencies ranging from 19% to 29% were registered. With the homopolymer PMMA and one of the fluorinated-copolymers efficiency values similar to those recorded in liquid phase were obtained, in spite of the polishing of the surfaces of the solid samples relevant to laser operation not being laser-grade, which results in higher losses in the optical cavity. Particularly noteworthy is the high photostability exhibited by the synthesized materials, especially for the dye doped PMMA material, where the laser emission remains at 50% of its initial value after 70,000 pump pulses at 5 Hz repetition rate in the same position of the sample. Under more drastic pumping conditions, increasing the repetition rate up to 10 Hz, the lasing photo-

**Fig. 3** Normalized laser output as a function of the number of pump pulses for the 8-PBDP dye incorporated into: (a) PMMA; (b) COP(MMA-TFMA 9:1) (v/v) and (c) COP(MMA-TFMA 7:3) (v/v), pumping at 5 Hz. Dye concentration:  $3 \times 10^{-3}$  M. Pump wavelength and energy: 355 nm and 5.5 mJ/pulse, respectively

stability decreases since the accumulation of the heat into the polymeric sample increases significantly with the pumping repetition rate [21, 22]. Nevertheless, even at these more demanding pumping conditions the laser output remains at 50% of its initial values after 45,000 pump pulses in the same position of the sample.

The lasing performance of the 8-PBDP dye incorporated into fluorinated matrices does not improve that recorded in pure PMMA. In fact, as the presence of the fluorinated monomer into the matrix increases, both the lasing efficiency and photostability of the dye decreases significantly. Although the photobleaching of dyes can occur by several different mechanisms and, from a general point of view, can be considered to be quite complex, photooxidation, in which chemically reactive singlet oxygen is formed by sensitization of ground-state triplet oxygen molecules by triplet state dyes [23], is maybe the degradation mechanism most often referred to and the one with strongest relevance. Thus, in matrices with a high fluorinated content, this degradation

process could be accelerated as a consequence of the higher oxygen permeability in fluorinated materials and the longer lifetime of singlet molecular oxygen in these media [24].

Lasing parameters of two well-known dyes (PM546 and C540A) with similar lasing wavelengths were measured in solutions under similar experimental conditions to calibrate the performance of 8-PBDP dye. Although PM546 exhibits laser emission centered at 541 nm with an efficiency of 23% in ethyl acetate liquid solution, it cannot be incorporated into PMMA matrix because the high dye concentration ( $2 \times 10^{-2}$  M) required to compensate its low absorption at the pump wavelength (355 nm) prevents the obtaining of matrices with the required optical quality to have efficient laser emission in solid state. Only with C540A dye ( $3 \times 10^{-3}$  M), it was possible to prepare solid matrices with good optical quality. Incorporated into PMMA and pumped under the same conditions as 8-PBDP dye, C540A exhibits laser emission centered at 530 nm with an efficiency of just 8% and very low stability, since the laser emission totally disappears after 15,000 pump pulses at 5 Hz repetition rate.

#### 4 Conclusions

In this paper, we report, for the first time to the best of our knowledge, efficient and stable laser emission from BODIPY dye incorporated into polymeric hosts under drastic UV pumping conditions. Lasing efficiency of up to 28% with high photostability since the laser output remaining at 50% of its initial value after 70,000 pump pulses in the same position of the sample at a repetition rate of 5 Hz was achieved for the 8-PBDP dye doped PMMA. Under the same experimental conditions, the much used commercial dye C540A exhibited a laser efficiency of 8% and fast degradation, since the laser emission ceases after 15,000 pump pulses at 5 Hz repetition rate. Considering the easy synthetic buildup, the wide variety of possible substituents and the large number of described BDP laser dyes, we are confident that this powerful approach can be applied to new dyes of this family, allowing to extend the tuning range of SSDLs to the blue-edge spectral region, impelling their practical applications in optical and sensing fields. Work toward these ends is in progress.

**Acknowledgements** This work was supported by Projects MAT-2010-20646-C04-01 and TRACE2009-0144 of the Spanish MICINN. V. Martín and M.E. Pérez-Ojeda thank CSIC for her JAE postdoctoral contract and predoctoral grant, respectively.

#### References

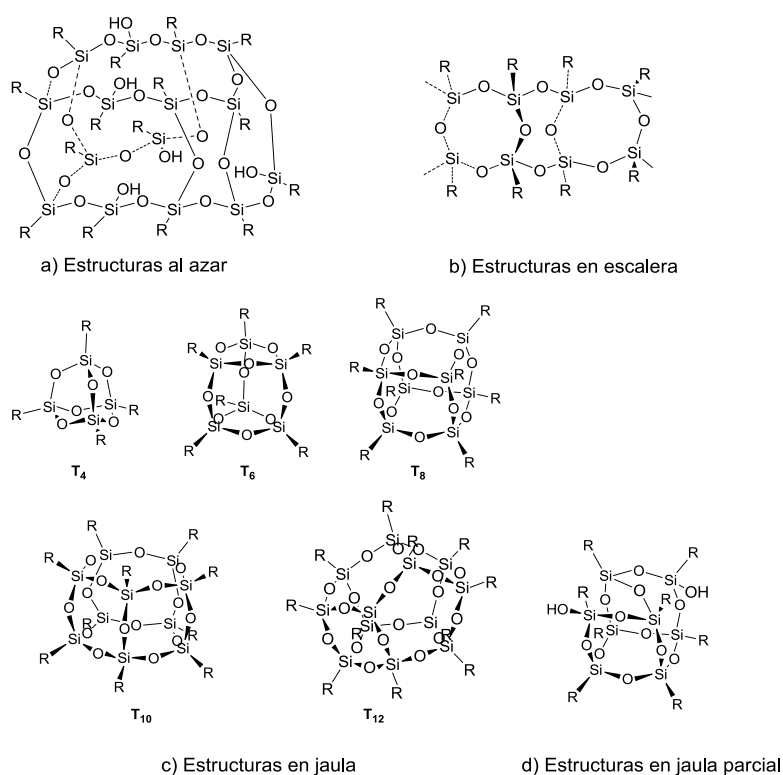
1. F.J. Duarte, *Tunable Laser Applications* (CRC Press, Boca Raton, 2008)
2. Y. Oki, S. Miyawaki, M. Maeda, M. Tanaka, *Opt. Rev.* **12**, 301 (2005)
3. C.M. Carbonaro, A. Anedda, S. Grandi, A. Magistris, *J. Phys. Chem. B* **110**, 12932 (2006)
4. R. Bornemann, U. Lemmer, E. Thiel, *Opt. Lett.* **31**, 1669 (2006)
5. G. Jordan, M. Flämmich, M. Rütger, T. Kobayashi, W.J. Blau, Y. Suzuki, T. Kaino, *Appl. Phys. Lett.* **88**, 161114 (2006)
6. Y. Yang, J. Zou, H. Rong, G.D. Qian, Z.Y. Wang, M.Q. Wang, *Appl. Phys. B* **86**, 309 (2007)
7. S. Yuyama, T. Nakajima, K. Yamashita, K. Oe, *Appl. Phys. Lett.* **93**, 023306 (2008)
8. I. García-Moreno, A. Costela, V. Martín, M. Pintado-Sierra, R. Sastre, *Adv. Funct. Mater.* **19**, 2547 (2009)
9. I. García-Moreno, A. Costela, M. Pintado-Sierra, V. Martín, R. Sastre, *J. Phys. Chem. B* **113**, 10611 (2009)
10. R. Sastre, V. Martín, L. Garrido, J.L. Chiara, B. Trastoy, O. García, A. Costela, I. García-Moreno, *Adv. Funct. Mater.* **19**, 3307 (2009)
11. V. Martín, A. Costela, M. Pintado-Sierra, I. García-Moreno, *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **219**, 265 (2011)
12. A. Sennaroglu, *Solid-State Lasers and Applications* (CRC Press, London, 2008)
13. S. Forget, H. Rabbani-Haghighi, N. Diffalah, A. Siove, S. Chénais, *Appl. Phys. Lett.* **98**, 131102 (2011)
14. A.N. Fletcher, M.E. Pietrak, *Appl. Phys. B, Lasers Opt.* **37**, 151 (1985)
15. B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Application* (Wiley-VCH, Weinheim, 2001)
16. A. Costela, I. García-Moreno, R. Sastre, *Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices* (Academic Press, San Diego, 2001)
17. S. Nad, M. Kumbhakar, H. Pal, *J. Phys. Chem. A* **107**, 4808 (2003)
18. C.F.A. Gómez-Durán, I. García-Moreno, A. Costela, V. Martín, R. Sastre, J. Bañuelos, F. López Arbeloa, I. López Arbeloa, E. Peña-Cabrera, *Chem. Commun.* **46**, 5103 (2010)
19. J. Bañuelos, V. Martín, C.F.A. Gómez-Durán, I.J. Arroyo Córdoba, E. Peña-Cabrera, I. García-Moreno, A. Costela, M.E. Pérez-Ojeda, T. Arbeloa, I. López Arbeloa, *Chem. Eur. J.* **17**, 7261 (2011)
20. J. Bañuelos, I.J. Arroyo-Córdoba, I. Valois-Escamilla, A. Álvarez-Hernández, E. Peña-Cabrera, R. Hu, B.Z. Tang, I. Esnal, V. Martínez, I. López Arbeloa, *RSC Adv.* **1**, 677 (2011)
21. A. Costela, I. García-Moreno, R. Sastre, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**, 4745 (2003)
22. R. Duchowicz, L.B. Scaffardi, A. Costela, I. García-Moreno, R. Sastre, A.U. Acuña, *Appl. Opt.* **42**, 1029 (2003)
23. F. Wilkinson, D.J. McGarvey, A.F. Olea, *J. Phys. Chem.* **98**, 3762 (1994)
24. A. Tyagi, D. del Agua, A. Penzkofer, O. García, R. Sastre, A. Costela, I. García-Moreno, *Chem. Phys.* **342**, 201 (2007)

## ***Capítulo 2***

*Nuevos colorantes híbridos BODIPY-POSS con estabilidad incrementada.*

## 2.1 Introducción

Los silsesquioxanos oligoméricos poliédricos (POSS)<sup>[1]</sup> son moléculas con forma de jaula o caja con una composición de tipo núcleo-corteza que constan de un armazón inorgánico de siloxano decorado con sustituyentes orgánicos en sus vértices. La rigidez del núcleo inorgánico hace de estas nanopartículas híbridas unas moléculas únicas por sus excelentes propiedades mecánicas y estabilidades térmicas que se transmiten parcialmente a los materiales nanocompuestos que los contienen. Estos materiales se están aplicando en áreas tan diversas como la ciencia de polímeros, los materiales compuestos, los dendrímeros, los materiales ópticos, recubrimientos, cristales líquidos, catalizadores metálicos soportados, o para la liberación controlada de fármacos e ingeniería de tejidos, por citar algunos de los ejemplos que aparecen descritos en la bibliografía, mayoritariamente en forma de patentes.<sup>[2]</sup>



**Figura 2.1** Principales estructuras de los silsesquioxanos.

Por su composición química  $(\text{RSiO}_{1.5})_n$ , los silsesquioxanos se pueden considerar como intermedios entre la sílica  $(\text{SiO}_2)_n$  y las siliconas  $(\text{R}_2\text{SiO})_n$ . Estos compuestos pueden presentar una estructura desordenada, en escalera, en forma de jaula o en forma de jaula parcial (Figura

2.1).<sup>[3]</sup> En los últimos años, los silsesquioxanos con estructura de jaula están cobrando una importancia creciente como demuestra la evolución del número de publicaciones en revistas científicas dedicadas a estos compuestos (Figura 2.2). Estos compuestos tienen una forma y tamaño bien definidos en el rango de 1 a 3 nm de diámetro. En cuanto a las estructuras en jaula, se pueden clasificar por el número de átomos de silicio, 6, 8, ó 10 ó 12 dando lugar a POSS T<sub>6</sub>, T<sub>8</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>12</sub> respectivamente, siendo T la estructura formada de la unión de 3 átomos de silicio a través de puentes de oxígeno, la más común es la estructura POSS T<sub>8</sub> (Figura 2.1).

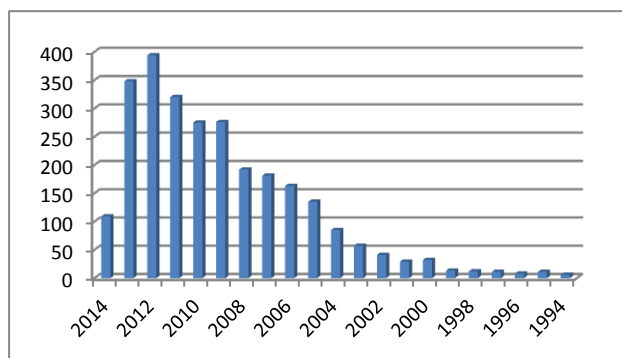
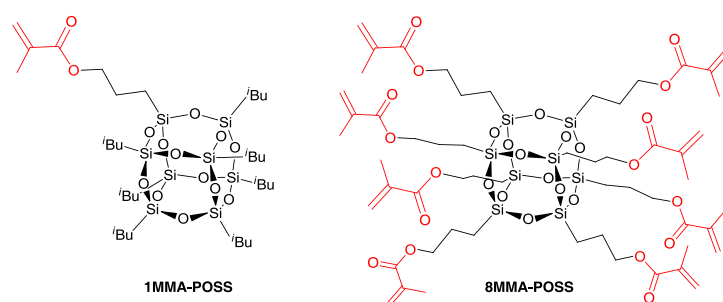


Figura 2.2 Publicaciones sobre POSS en los últimos 20 años.<sup>[4]</sup>

Los POSS se sintetizan habitualmente por condensación hidrolítica de organosilanos de tipo  $\text{RSiX}_3$  (R = sustituyente orgánico, X = halógeno o alcóxido) y pueden ser fácilmente modificados tanto en la caja inorgánica (T<sub>8</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>12</sub>, etc.)<sup>[5]</sup> como en sus sustituyentes orgánicos con reacciones sencillas. El número y tipo de sustituyentes controlan las interacciones entre el ligando orgánico exterior y el medio, definiendo la compatibilidad y, por tanto, las propiedades finales de los materiales modificados por la presencia de POSS. Las nanopartículas de POSS pueden dispersarse en el medio a nivel molecular (1-3 nm), lo que evita la agregación y separación de fases, asegurando así una elevada homogeneidad macroscópica de los materiales a los que se incorpora.<sup>[6]</sup> Su incorporación a polímeros se ha empleado para la preparación de nuevos materiales con propiedades mejoradas como por ejemplo, mayor resistencia a la temperatura y a la oxidación, mejores propiedades mecánicas, menor inflamabilidad. Además, por su geometría y la distribución espacial tridimensional de los sustituyentes, se han utilizado para la preparación de dendrímeros con propiedades fotoluminiscentes interesantes<sup>[7]</sup> en los que se anclaron distintos cromóforos (pireno,<sup>[8]</sup> estilbeno,<sup>[9]</sup> naftil-antraceno,<sup>[10]</sup> polifenilenos,<sup>[11]</sup> perilendiimida,<sup>[12]</sup> fluoresceína,<sup>[13]</sup> cloruro de dansilo,<sup>[14]</sup> olifluorenos<sup>[15]</sup> o complejos metálicos<sup>[16]</sup>) al POSS.



Con el objetivo de mejorar la estabilidad de los colorantes láser empleados en nuestro grupo de investigación, se han preparado en los últimos años nuevos materiales basados en POSS. Así, se introdujeron diversos colorantes (rodamina 6G, cumarina 503, perileno rojo y los BODIPYs PM567 y PM597) disueltos en matrices poliméricas que incorporaban POSS en su composición, bien como copolímeros de MMA con distintas proporciones en peso (del 1 al 50%) de co-monómeros como heptaisobutil-metacriloxipropil-POSS (1MMA-POSS) u octaquis(metacriloxipropil)-POSS (8MMA-POSS) (Figura 2.3.), o bien como agentes dopantes en forma de POSS no polimerizables.<sup>[17]</sup> Dado que la presencia de nanopartículas de POSS incrementó significativamente tanto la eficiencia como la fotoestabilidad láser con respecto a los valores obtenidos cuando se les incorpora en matrices puramente orgánicas, se diseñó la síntesis de nuevos cromóforos unidos covalentemente al POSS.



**Figura 2.3** Estructura de los comonómeros de POSS empleados en las nuevas matrices híbridas para colorantes láser en estado sólido.

Existen otros ejemplos en la literatura de POSS unidos a BODIPYs<sup>[18]</sup> en los que se ha concluido que la unión covalente del colorante al POSS incrementa su estabilidad térmica y fotoquímica y que las propiedades fotofísicas de los cromóforos prácticamente no se ven alteradas, exhibiendo altos rendimientos cuánticos de fluorescencia.

## 2.2 Resultados y discusión

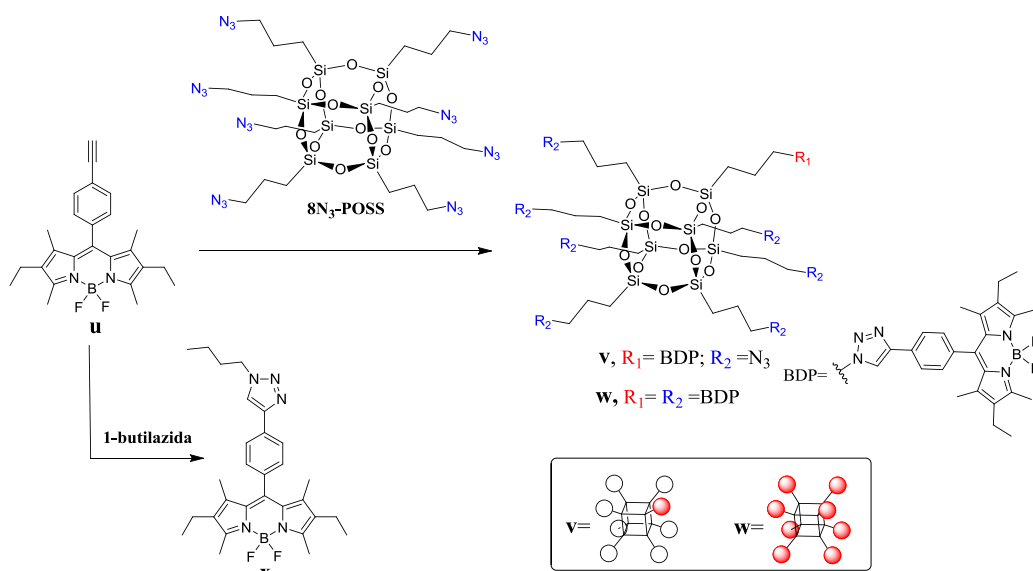
Con estos antecedentes, nos planteamos la síntesis de nuevos colorantes híbridos que, sin deteriorar sus propiedades ópticas, alcancen la foto- y termoestabilidad requeridas para su aplicación como colorantes fluorescentes y láser. La funcionalización con el silsesquioxano permitirá mejorar las propiedades térmicas por la presencia del armazón inorgánico, que favorece la disipación del calor, y por otro lado, gracias al carácter polifuncional de los

silsesquioxanos, permite modificar el número de cromóforos que se incorporan al núcleo de POSS. Dependiendo del tipo de unión covalente seleccionado, se podría, en principio, modular la conjugación entre las nubes  $\pi$  de los cromóforos a través del armazón inorgánico<sup>[19]</sup> y con ella la longitud de onda de emisión. Los resultados correspondientes a los nuevos BODIPY híbridos así diseñados se resumen a continuación; la discusión de resultados completa puede encontrarse en el artículo anexo (Artículo 7).

**Artículo 7: “Click Assembly of Dye-Functionalized Octasilsesquioxanes for Highly Efficient and Photostable Photonic Systems”** *Chem. Eur J.* **2011**, 17, 13258.

*1. Síntesis*


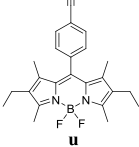
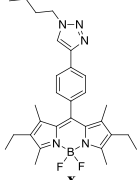
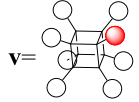
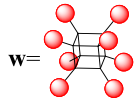
Se han sintetizado nuevos colorantes híbridos por unión covalente entre un BODIPY, análogo al derivado comercial PM567 con un grupo *p*-fenilacetileno en posición meso (compuesto **u**, Esquema 2.1) y el octakis(3-azidopropil)-POSS, mediante reacción de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizada por cobre(I) (CuAAC). El control de la estequiometría así como de los catalizadores empleados (como se detallará en el capítulo siguiente) nos permitió sintetizar tanto el derivado monosustituido de POSS con un solo BODIPY (compuesto **v**, Esquema 2.1), como el totalmente sustituido por incorporación de ocho BODIPYs. (compuesto **w**, Esquema 2.1). Además, para estudiar el efecto del espaciador cromóforo-POSS sobre las propiedades ópticas, se sintetizó un compuesto modelo por reacción entre el BODIPY funcionalizado con *p*-fenilacetileno y 1-butilazida para dar un triazolil-BODIPY (compuesto **x**, Esquema 2.1) con una cadena lateral similar a la que se encuentra en los dos BODIPY-POSS sintetizados.



## 2. Propiedades fotofísicas

En primer lugar, se estudió el efecto del espaciador utilizado para unir el BODIPY al POSS sobre las propiedades fotofísicas del cromóforo. Aunque no se observan cambios significativos en las bandas de absorción y de emisión con respecto a las del BODIPY PM567 (Tabla 2.1), tan solo un leve desplazamiento batocrómico debido a la presencia del anillo aromático en posición meso, la introducción del grupo acetileno (compuesto **u**, Tabla 2.1) provocó una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia, que se recupera tras la reacción “click” (compuesto **x**, Tabla 2.1). El BODIPY **x** presenta una fotofísica muy similar a la de PM567, por lo que el espaciador, que se encuentra en un plano perpendicular al del cromóforo, no afecta a sus propiedades y es por ello adecuado para la unión covalente a POSS. El derivado híbrido con una sola unidad de BODIPY (compuesto **v**, Tabla 2.1) presentó un rendimiento cuántico elevado (60%), sin embargo, el rendimiento del derivado con 8 cromóforos (compuesto **w**, Tabla 2.1) disminuyó drásticamente. Para explicar este efecto, se llevó a cabo una modelización con cálculos semiempíricos AM1 que demostró que, a pesar de la baja tendencia de los BODIPYs a la agregación, en este sistema tienden a situarse de forma paralela a ambos lados del cubo provocando un enfrentamiento cofacial formando agregados de tipo-H que permiten la interacción de sus nubes  $\pi$ , provocan la pérdida de planaridad del indaceno y favorecen los procesos de conversión interna en detrimento de la fluorescencia.

**Tabla 2.1** Propiedades fotofísicas y láser de los nuevos colorantes híbridos BODIPY-POSS y sus análogos

Compuesto	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{flu}}$ (nm)	$\phi$	$\lambda_{\text{laser}}^{[a]}$ (nm)	Ef (%)	I (%) [ $1 \times 10^5$ ]
 PM567	522	537	0.70	563	35	71
 <b>u</b>	527	542	0.54	558	61	90
 <b>x</b>	526	540	0.67	558	60	80
 <b>v</b>	526	540	0.60	560	61	97
 <b>w</b>	523	545	0.25	-	-	-

### 3. Propiedades láser

Para analizar las propiedades láser de los nuevos colorantes, estos se irradiaron bajo condiciones estándar utilizando el segundo armónico del láser de Nd:YAG a 532 nm. Los nuevos BODIPYs **u** y **x** presentaron mejores eficiencias (61 y 60%, respectivamente) que el derivado comercial PM567 (35%) en disolución de AcOEt y resultaron ser además altamente fotoestables ya que mantuvieron el 90 y 80%, respectivamente, de su emisión inicial tras ser bombeados a 10 Hz durante  $1 \times 10^5$  pulsos (Tabla 2.1). El colorante híbrido **v** mantuvo la misma eficiencia que su BODIPY precursor **u** (61%) y, gracias a la unión covalente a POSS, incrementó su fotoestabilidad ya que mantuvo el 100% de su emisión inicial tras ser bombeado a 10 Hz durante  $1 \times 10^5$  pulsos. No fue posible obtener emisión láser del híbrido **w**, ni siquiera bajo condiciones drásticas de bombeo.

Los derivados BODIPYs **u**, **x** y el colorante híbrido **v** se emplearon para la síntesis de materiales láser en estado sólido. Para la preparación de las matrices sólidas, se eligieron los monómeros miméticos de los disolventes en los que se obtuvieron las eficiencias más elevadas en disolución. Se emplearon matrices de PMMA así como copolímeros de MMA y TFMA

(monómero fluorado). Además, en el caso del colorante híbrido **v** se preparó un material en el que se adicionó el 8MMA-POSS como co-monómero. Las propiedades láser observadas se recogen en la Tabla 2.2. El colorante híbrido **v** mejora notablemente la eficiencia con respecto al BODIPY precursor **u** (52% respecto a 40%, Tabla 2.2) en PMMA, que se incrementa aún más (56%) cuando se copolimeriza el material con un 13% de 8MMA-POSS. Este material no presentó signos de degradación tras ser bombeado a 10 Hz durante  $1 \times 10^5$  pulsos. Se estudió también la fotoestabilidad de **v** en matriz de PMMA en condiciones más drásticas de bombeo, a 30 Hz durante  $4 \times 10^5$  pulsos tras los que mantuvo el 100% de su emisión inicial demostrando la alta estabilidad alcanzada mediante la unión covalente a POSS.

**Tabla 2.2** Propiedades láser de los compuestos **u-x** en distintas matrices sólidas.

Compuesto	PMMA			co(MMA/TFMA (70:30))			co(MMA/8MMA-POSS) (87:13)		
	Ef(%)	$\lambda_{\text{láser}}$	I(%)	Ef(%)	$\lambda_{\text{láser}}$	I(%)	Ef(%)	$\lambda_{\text{láser}}$	I(%)
<b>u</b>	40	560	97	36	560	82	-	-	-
<b>x</b>	38	559	77	31	558	72	-	-	-
<b>v</b>	52	560	100	-	-	-	56	558	100

### 2.3 Conclusiones

- 1) Se ha desarrollado una metodología eficaz para la síntesis de colorantes híbridos por unión covalente al núcleo de silsesquioxano POSS-T<sub>8</sub>. El grupo conector resultante de la reacción de CuAAC no afecta a la fotofísica del BODIPY así unido y mejora su eficiencia láser.
- 2) El número de cromóforos unidos covalentemente a un núcleo de POSS afecta sensiblemente a sus propiedades fotofísicas ya que, a pesar de la baja tendencia de los BODIPYs a agregar, la geometría de la molécula y la flexibilidad conformacional del grupo conector empleado favorece la formación de agregados de tipo-H.
- 3) El colorante híbrido **v** presentó una eficiencia láser mejorada (hasta el 60%) con respecto a la de su BODIPY precursor y el derivado comercial PM567 y una fotoestabilidad excelente incluso bajo condiciones muy drásticas de bombeo ( $4 \times 10^5$  pulsos a 30 Hz).

## Referencias

- [1] a) D. B. Cordes, P. D. Lickiss and F. Rataboul, *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2081-2173; b) P. D. Lickiss and F. Rataboul in *Fully condensed polyhedral oligosilsesquioxanes(POSS): From synthesis to application*, Vol. 57 Eds.: A. F. Hill and M. J. Fink), **2008**, pp. 1-116.
- [2] a) R. M. Laine, C. X. Zhang, A. Sellinger and L. Viculis, *Applied Organometallic Chemistry* **1998**, *12*, 715-723; b) R. M. Laine, *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 3725-3744; c) D. Gnanasekaran, K. Madhavan and B. S. R. Reddy, *J. Sci. Ind. Res.* **2009**, *68*, 437-464; d) R. M. Laine and M. F. Roll, *Macromolecules* **2011**, *44*, 1073-1109; e) S.-W. Kuo and F.-C. Chang, *Progress in Polymer Science* **2011**, *36*, 1649-1696; f) F. Wang, X. Lu and C. He, *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 2775-2782; g) in *Applications of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes*, Vol. 3 (Ed. C. Hartmann-Thompson), Springer Netherlands, **2011**; h) K. Tanaka and Y. Chujo, *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 1733-1746; i) K. Tanaka and Y. Chujo, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 1733-1746; j) S. Fabritz, S. Hoerner, O. Avrutina and H. Kolmar, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 2224-2236; k) K. Tanaka and Y. Chujo, *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)* **2013**, *45*, 247-254.
- [3] a) M. G. Voronkov and V. I. Lavrent'yev, *Top. Curr. Chem.* **1982**, *102*, 199-236; b) V. Lorenz and F. T. Edelmann, *Adv. Organomet. Chem.* **2005**, *53*, 101-153.
- [4] Datos obtenidos de SciFinder a 26/04/2014 empleando POSS y silsesquioxane como palabras claves para la búsqueda.
- [5] a) E. Rikowski and H. C. Marsmann, *Polyhedron* **1997**, *16*, 3357-3361; b) F. J. Feher, R. Terroba and J. W. Ziller, *Chemical Communications* **1999**, 2153-2154; c) V. Ervithayasuporn, X. Wang and Y. Kawakami, *Chemical Communications* **2009**, 5130-5132; d) M. Z. Asuncion and R. M. Laine, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 3723-3736; e) M. Ronchi, S. Sulaiman, N. R. Boston and R. M. Laine, *Applied Organometallic Chemistry* **2010**, *24*, 551-557; f) R. M. Laine, J. Furgal, M. Bahrami, H. Hashemi, J. Kieffer, X. Maier and T. Goodson, **2013**, pp. POLY-144; g) R. M. Laine, J. H. Jung, J. C. Furgal, K. Chou, M. Schwartz and T. Goodson, III, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **2012**, *53*, 543; h) R. M. Laine, J. Jung, J. C. Furgal, K. Chou, M. Schwartz and T. Goodson, **2012**, pp. POLY-415.
- [6] a) S. Bizet, J. Galy and J.-F. Gerard, *Macromolecules* **2006**, *39*, 2574-2583; b) S. Bizet, J. Galy and J.-F. Gerard, *Polymer* **2006**, *47*, 8219-8227.
- [7] K. L. Chan, P. Sonar and A. Sellinger, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 9103-9120.
- [8] a) M. Y. Lo, K. Ueno, H. Tanabe and A. Sellinger, *Chem. Rec.* **2006**, *6*, 157-168; b) M. Y. Lo, C. Zhen, M. Lauters, G. E. Jabbour and A. Sellinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5808-5809; c) H. Bai, C. Li and G. Shi, *Chemphyschem* **2008**, *9*, 1908-1913.
- [9] a) J. C. Furgal, J. H. Jung, T. Mizumoto, K. Chou, M. Schwartz, T. Goodson, III and R. M. Laine, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **2012**, *53*, 15-16; b) J. Hwan Jung, J. C. Furgal, T. Goodson, T. Mizumoto, M. Schwartz, K. Chou, J.-F. Vonet and R. M. Laine, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 1883-1895; c) R. M. Laine, J. H. Choi and S. Clark, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **2011**, *52*, 125-126; d) S. Sulaiman, A. Bhaskar, J. Zhang, R. Guda, T. Goodson, III and R. M. Laine, *Chemistry of Materials* **2008**, *20*, 5563-5573.
- [10] J.-H. Eom, D. Mi, M.-J. Park, H.-J. Cho, J. Lee, J.-I. Lee, H. Y. Chu, H.-K. Shim and D.-H. Hwang, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9*, 7029-7033.
- [11] a) M. F. Roll, J. W. Kampf and R. M. Laine, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2011**, *44*, 3425-3435; b) N. R. Vautravers, P. Andre, A. M. Z. Slawin and D. J. Cole-Hamilton, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 717-724.
- [12] X. Ren, B. Sun, C.-C. Tsai, Y. Tu, S. Leng, K. Li, Z. Kang, R. M. Van Horn, X. Li, M. Zhu, C. Wesdemiotis, W.-B. Zhang and S. Z. D. Cheng, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 4802-4810.

- [13] S. Fabritz, D. Heyl, V. Bagutski, M. Empting, E. Rikowski, H. Frauendorf, I. Balog, W.-D. Fessner, J. J. Schneider, O. Avrutina and H. Kolmar, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 2212-2218.
- [14] S.-y. Kuwahara, K. Yamamoto and J.-i. Kadokawa, *Chemistry Letters* **2010**, *39*, 1045-1047.
- [15] a) G. Feng, D. Ding and B. Liu, *Nanoscale* **2012**, *4*, 6150-6165; b) K.-Y. Pu, K. Li and B. Liu, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2010**, *22*, 643-646; c) K.-Y. Pu and B. Liu, *Advanced Functional Materials* **2011**, *21*, 3408-3423; d) K.-Y. Pu, Z. Luo, K. Li, J. Xie and B. Liu, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 13069-13075.
- [16] a) X. Yang, J. D. Froehlich, H. S. Chae, B. T. Harding, S. Li, A. Mochizuki and G. E. Jabbour, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 4776-4782; b) J. D. Froehlich, R. Young, T. Nakamura, Y. Ohmori, S. Li, A. Mochizuki, M. Lauters and G. E. Jabbour, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 4991-4997; c) X. Yang, J. D. Froehlich, H. S. Chae, S. Li, A. Mochizuki and G. E. Jabbour, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 2623-2629.
- [17] a) A. Costela Gonzalez, O. Garcia Ballesteros, I. Garcia-Moreno, V. Martin Torres and R. Sastre Munoz in *Preparation of silylated copolymers with silsesquioxane groups and use as highly photostable laser matrix*, Vol. Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Spain . **2009**, p. 33pp; b) O. Garcia, R. Sastre, I. Garcia-Moreno, V. Martin and A. Costela, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 14710-14713; c) R. Sastre, V. Martin, L. Garrido, J. L. Chiara, B. Trastoy, O. Garcia, A. Costela and I. Garcia-Moreno, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3307-3316.
- [18] a) M. Liras, M. Pintado-Sierra, F. Amat-Guerri and R. Sastre, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 12803-12811; b) C. McCusker, J. B. Carroll and V. M. Rotello, *Chemical Communications* **2005**, 996-998.
- [19] a) S. Sulaiman, A. Bhaskar, J. Zhang, R. Guda, T. Goodson, III and R. M. Laine, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 5563-5573; b) R. M. Laine, S. Sulaiman, C. Brick, M. Roll, R. Tamaki, M. Z. Asuncion, M. Neurock, J. S. Filhol, C. Y. Lee, J. Zhang, T. Goodson, M. Ronchi, M. Pizzotti, S. C. Rand and Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3708-3722; c) S. Sulaiman, J. Zhang, T. Goodson, III and R. M. Laine, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 11177-11187; d) J. H. Jung, J. C. Furgal, S. Clark, M. Schwartz, K. Chou and R. M. Laine, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2013**, *46*, 7580-7590.

## ***Anexo al Capítulo 2***





# Click Assembly of Dye-Functionalized Octasilsesquioxanes for Highly Efficient and Photostable Photonic Systems

M. Eugenia Pérez-Ojeda,<sup>[a]</sup> Beatriz Trastoy,<sup>[b]</sup> Íñigo López-Arbeloa,<sup>\*,[c]</sup> Jorge Bañuelos,<sup>[c]</sup> Ángel Costela,<sup>[a]</sup> Inmaculada García-Moreno,<sup>\*,[a]</sup> and Jose Luis Chiara<sup>\*,[b]</sup>

*Dedicated to the memory of Professor Roberto Sastre*

**Abstract:** New hybrid organic–inorganic dyes based on an azide-functionalized cubic octasilsesquioxane (POSS) as the inorganic part and a 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BDP) chromophore as the organic component have been synthesized by copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of azides to alkynes. We have studied the effects of the linkage group of BDP to the POSS unit and the degree of functionalization of this inorganic core on the ensuing optical properties by comparison with model dyes. The high fluorescence of the BDP dye is preserved in spite of the linked chain

at its *meso* position, even after attaching one BDP moiety to the POSS core. The laser action of the new dyes has been analyzed under transversal pumping at 532 nm in both the liquid phase and when incorporated into solid polymeric matrices. The monosubstituted new hybrid dye exhibits high lasing efficiency of up to 56% with high photostability, with its laser output remaining at the initial value after  $4 \times 10^5$  pump

pulses in the same position of the sample at a repetition rate of 30 Hz. However, functionalization of the POSS core with eight fluorophores leads to dye aggregation, as quantum mechanical simulation has revealed, worsening the optical properties and extinguishing the laser action. The new hybrid systems based on dye-linked POSS nanoparticles open up the possibility of using these new photonic materials as alternative sources for optoelectronic devices, competing with dendronized or grafted polymers.

**Keywords:** azides • click chemistry • dyes/pigments • hybrids • silsesquioxanes

## Introduction

Fully condensed polyhedral oligosilsesquioxanes (POSS) are unique nanometer-sized hybrid inorganic–organic materials of chemical composition  $(\text{RSiO}_{1.5})_n$ , which can be readily synthesized by hydrolytic condensation of trifunctional organosilicon monomers  $\text{RSiX}_3$  ( $\text{R}$  = organic group;  $\text{X}$  = halogen

or alkoxide group).<sup>[1]</sup> Thanks to their rigid inorganic cores, POSS are endowed with considerable chemical and thermal stability, which can be channeled to their pendant organic groups.

POSS nanoparticles have found novel applications in photonics and electronic devices,<sup>[2]</sup> significantly enhancing the thermal, mechanical, and physical properties of the final materials and opening the challenge to synthesize new luminescent hybrid matrices with optoelectronic properties comparable to those of dendronized or grafted conjugated polymers.<sup>[3]</sup> POSS nanoparticles can be dispersed at a molecular level (0.5–5 nm)<sup>[4]</sup> and, because of their synthetically well-controlled functionalization, can be incorporated into polymers by different polymerization techniques with minimal processing disruption.<sup>[5]</sup> This excellent dispersion at the molecular scale and the copolymerization with organic monomers prevents phase separation, thereby ensuring macroscopic homogeneity of the resultant materials.<sup>[6]</sup> In this way, new optical hybrid materials based on POSS nanoparticles as the inorganic part overcome some of the most important limitations intrinsic to sol–gel hybrid composites while maintaining the combined physical, chemical, and mechanical advantages of organic–inorganic systems.<sup>[7]</sup>

We demonstrated, for the first time, the behavior of POSS-doped systems as disordered nanomaterials, which was to the best of our knowledge a possibility never consid-

[a] M. E. Pérez-Ojeda, Prof. Dr. Á. Costela, Prof. Dr. I. García-Moreno  
Instituto Química-Física “Rocasolano”, C.S.I.C.  
Serrano 119, 28006 Madrid (Spain)  
Fax: (+34) 915642431  
E-mail: i.garcia-moreno@iqfr.csic.es

[b] B. Trastoy, Dr. J. L. Chiara  
Instituto de Química Orgánica General, C.S.I.C.  
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid (Spain)  
Fax: (+34) 915644853  
E-mail: jl.chiara@iqog.csic.es

[c] Prof. Dr. Í. López-Arbeloa, Dr. J. Bañuelos  
Departamento de Química Física  
Universidad del País Vasco-EHU  
Facultad de Ciencias y Tecnología  
Apartado 644, 48080 Bilbao (Spain)  
Fax: (+34) 946013500  
E-mail: inigo.lopezarbeloa@ehu.es

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201100512>.

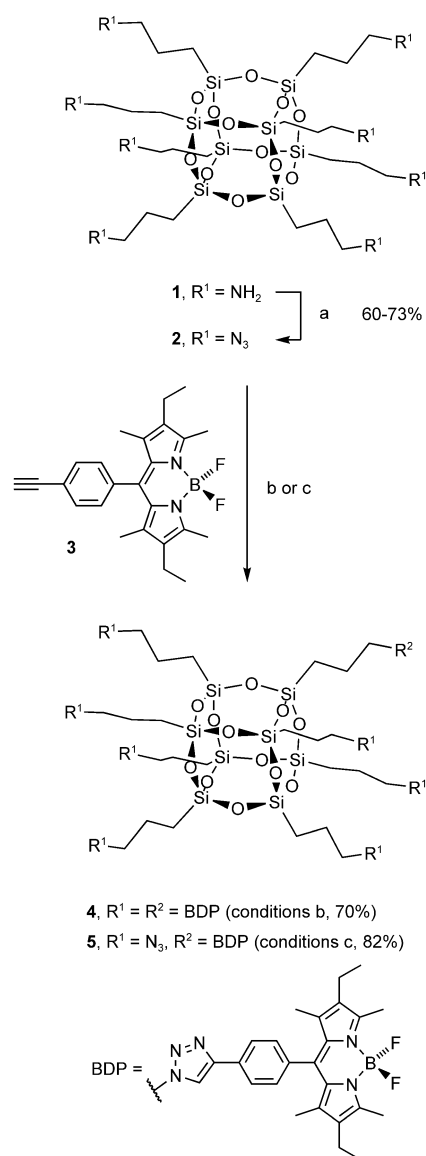
ered before.<sup>[8]</sup> The dispersion of POSS nanoparticles at a molecular level defines highly homogeneous materials that, when doped with lasing dyes, allow coherent laser emission but, in addition and in spite of their nanometer size, the POSS particles sustain a weak optical scattering that helps lasing by elongating the light path inside the gain media, thus providing an extra feedback, a phenomenon central to the process called “incoherent random lasing” or “lasing with intensity feedback”.<sup>[9]</sup> In this way, the laser action in systems based on dye-doped POSS materials is significantly enhanced, in both the liquid and solid phases.<sup>[7]</sup>

The unique chemical and optical properties exhibited by POSS nanoparticles have led us to design new hybrid photonic systems based on POSS labeled with fluorescent dyes as pendant groups on their rigid inorganic cores. Herein, we report the synthesis and characterization of new hybrid organic–inorganic dyes based on azide-functionalized POSS as the inorganic part, and a 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene (BDP) chromophore as the organic component, which was selected for its interesting photophysical and photochemical properties both in the liquid phase and in doped solid matrices.<sup>[10]</sup> It was anticipated that the new hybrid systems would exhibit highly efficient, stable, and tunable laser emission with improved thermal properties owing to the chemical attachment of the fluorophore to the rigid inorganic framework, strengthening their biomedical and photonic applications. To study the effects of both the linkage group through which BDP is attached to the POSS unit and the degree of functionalization of the inorganic core on the optical properties, we proceeded to synthesize model dyes as well as mono- and octa-substituted BDP–POSS hybrid derivatives.

## Results and Discussion

### Synthesis and characterization

We recently described the synthesis of octakis(3-azidopropyl)octasilsesquioxane (**2**), a highly symmetrical and topologically ideal cube-octameric POSS monomer containing eight azide groups (Scheme 1).<sup>[11]</sup> Compound **2** could be readily obtained in one-step from commercially available octakis(3-aminopropyl)octasilsesquioxane (**1**) using a highly efficient diazo-transfer reaction promoted by nonafllyl azide,<sup>[12]</sup> a shelf-stable diazo-transfer reagent. The very mild conditions of this reaction prevented nucleophile-induced cage rearrangements,<sup>[13]</sup> which are common in alternative routes to **2** involving nucleophilic substitution reactions with azide ion.<sup>[14]</sup> Compound **2** is an excellent nano building block for the synthesis of new functional nanocages with perfect 3D cubic symmetry through copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide–alkyne cycloaddition (CuAAC)<sup>[15]</sup> with a variety of terminal alkynes.<sup>[11,14a,c,d]</sup> The versatility of this approach has been demonstrated by the preparation of the dye–POSS cluster **4** using the alkyne-substituted BDP fluorescent dye **3** (Scheme 1).<sup>[11]</sup>



Scheme 1. a)  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{SO}_2\text{N}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , cat.  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ , RT, 16 h; b) cat.  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , sodium ascorbate,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ , RT, 4.5 h (**2/3** molar ratio = 1:10); c) cat.  $[\text{Cu}(\text{C18}_{\text{tren}})]\text{Br}$ ,  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ , toluene, 80 °C (MW), 6 h (**2/3** molar ratio = 10:1).

We have now studied the monofunctionalization of octa-azide **2** with BDP dye **3**. This reaction affords a POSS derivative **5** labeled with a single fluorescent probe and containing seven additional reactive azide groups suitably predisposed for further functionalization with any molecule of interest having a terminal alkynyl group (Scheme 1). Besides, compound **5** would be an interesting hybrid dye for the preparation of solid-state laser materials with improved thermal and chemical stability. Full details of our study of

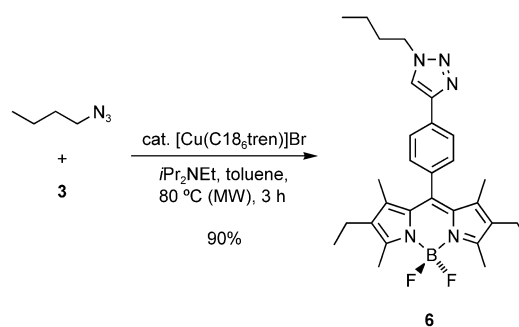
the CuAAC monofunctionalization reaction of octa-azide **2** under different reaction conditions will be published elsewhere. The optimized conditions involved the use of a ten-fold molar excess of **2** over alkyne **3**, to guarantee a high statistical selectivity for the monofunctionalized product **5**, and the recently described<sup>[16]</sup> [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br (C18<sub>6</sub>tren = tris(2-dioctadecylaminoethyl)amine) catalyst with added Hünig's base in toluene as solvent under microwave heating. These optimized conditions afforded a high yield of **5** (82 %), close to the expected statistical value (95.6 %). The rest of the alkyne **3** was transformed into a complex mixture of polytriazolyl POSS products, as shown by <sup>1</sup>H NMR analysis of the remaining mixed fractions from column chromatography. The structure of **5** was unambiguously confirmed by its high-resolution mass spectrometry and multinuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>29</sup>Si) NMR spectroscopy data (see the Supporting Information).

We have studied the thermal stabilities of POSS derivatives **4** and **5** by thermogravimetric analysis (TGA) (see the Supporting Information). TGA of compound **4** under nitrogen atmosphere showed an initial 7.4 % mass loss at about 100 °C attributable to the loss of water from the hygroscopic compound, followed by a 48 % mass loss at about 364 °C due to degradation of the POSS itself. In air, the thermogram again showed an initial 5.8 % mass loss of water at about 100 °C, followed by a two-stage decomposition process characterized by 26.7 % and 48.4 % mass losses starting at around 364 °C and 445 °C, respectively, with a final char yield of 14.6 % at 800 °C, which is slightly higher than expected for just SiO<sub>2</sub> formation (calculated 11.1 %). For comparison, the model BDP dye PM567 (Figure 2) showed an onset decomposition temperature of around 204 °C in its thermogram in air (see the Supporting Information), which is about 160 °C lower than that of hybrid BDP-POSS cluster **4**, confirming our expectations concerning the thermal stabilizing effect of the covalently bonded POSS core. TGA of compound **5** under nitrogen showed a two-stage decomposition process with an onset temperature of about 147 °C and a mass loss of 13.7 %, attributed to the loss of seven N<sub>2</sub> molecules from decomposition of the seven azide groups, followed by a second mass loss of 24.7 % starting at about 380 °C. In air, an initial 14.0 % mass loss was observed starting at about 138 °C, corresponding again to loss of N<sub>2</sub> from the seven azide groups, followed by a 45.7 % mass loss starting at about 314 °C, with a final char yield of 34.7 % at 800 °C, which is also in this case somewhat higher than expected for SiO<sub>2</sub> formation (calculated 32.2 %).

To study the photophysical properties of the BDP-POSS constructs **4** and **5**, we also prepared the new BDP dye **6** as a model system in which a methyl group is attached in place of the POSS core. Compound **6** was readily obtained by the CuAAC reaction of **3** with 1-azidobutane (Scheme 2).

### Photophysical and lasing characterization

Studies were carried out to analyze the dependences of both the photophysical properties and the laser performances of



Scheme 2. Synthesis of model BDP dye **6**.

the new BDP dyes on different experimental parameters, such as the linkage group through which the chromophore is attached to the POSS core, the degree of functionalization of the core, the nature of the solvent, and the composition of the host matrix.

**Influence of substitution at C-8 of PM567 (compounds **3** and **6**):** Before attaching the BDP derivatives to a POSS core, it is essential to characterize the influence of the linking unit on the photophysics of the BDP chromophore. Hence, appropriate model dyes were firstly analyzed.

**Photophysical characterization:** The absorption spectra and fluorescence decay curves of model dyes **3** and **6** measured in the same solvent are depicted in Figure 1. In general, the

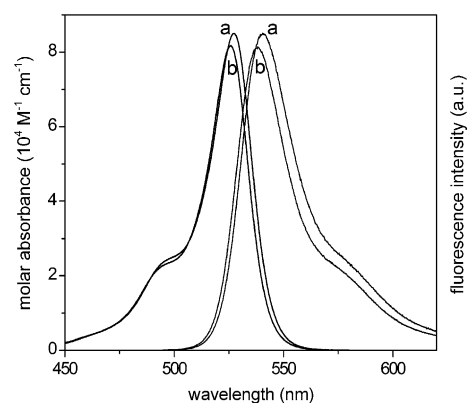
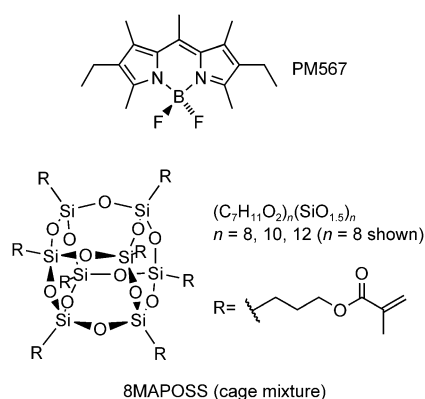


Figure 1. Absorption and fluorescence spectra of compounds **3** (a) and **6** (b) in cyclohexane.

shape and position of the spectral bands of both model dyes bearing *para*-phenyl substituents are similar to those of the parent PM567 dye (Scheme 3)<sup>[17]</sup> and other 8-phenyl analogues.<sup>[18]</sup> The steric hindrance introduced by the methyl groups flanking the *meso* position of the chromophore hampers the resonant interaction between the electronic clouds of the phenyl group and the BDP core. In fact, such a constrained structure results in an almost perpendicular disposition of the phenyl group with respect to the chromophoric plane, reducing its influence on the BDP core.<sup>[19]</sup>



Scheme 3.

Table 1 lists the photophysical properties of dyes **3–6** in a common solvent. For comparison purposes, the corresponding data of the parent BDP dye (PM567), recorded under

Table 1. Photophysical properties of compounds **3**, **4**, **5**, **6**, and PM567 (reference dye)<sup>[17]</sup> in cyclohexane.<sup>[a]</sup>

Compounds	$\lambda_{\text{abs}}$	$\epsilon_{\text{max}}$	$\lambda_{\text{fl}}$	$\phi$	$\tau$	$k_{\text{fl}}$	$k_{\text{nr}}$
<b>3</b>	527.5	8.5	542.0	0.54	2.96	1.82	1.55
<b>4</b> <sup>[b]</sup>	523.0	38.0	545.0	0.25	3.66 (59%) 2.15 (24%) 0.35 (17%)	–	–
<b>5</b>	526.0	5.8	540.0	0.60	3.86	1.55	1.03
<b>6</b>	526.0	8.1	540.0	0.67	3.74	1.79	0.88
PM567	522.5	9.3	537.0	0.70	5.60	1.25	0.53

[a] Absorption ( $\lambda_{\text{abs}}$ ,  $\pm 0.5$  nm) and fluorescence ( $\lambda_{\text{fl}}$ ,  $\pm 0.5$  nm) wavelength, molar absorption ( $\epsilon_{\text{max}}$ ,  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), fluorescence quantum yield ( $\phi$ ,  $\pm 0.05$ ) and lifetime ( $\tau$ ,  $\pm 0.05$  ns), radiative ( $k_{\text{fl}}$ ,  $10^8 \text{ s}^{-1}$ ), and nonradiative ( $k_{\text{nr}}$ ,  $10^8 \text{ s}^{-1}$ ) deactivation rate constants. [b] Compound **4** was found to be insoluble in cyclohexane, hence the data shown were obtained in acetone. The full data in different solvents are listed in Tables S1 and S2 in the Supporting Information.

identical experimental conditions, are also included in Table 1 (see also Table S1 in the Supporting Information for photophysical data in different solvents). With respect to the PM567 dye, the presence of a *p*-phenyl group linked to the *meso* position of the BDP core induced a slight bathochromic shift of the absorption and fluorescence bands, an increase in the nonradiative deactivation constant, and, consequently, a slight decrease in the fluorescence quantum yield and lifetime. It has previously been reported that the free rotation of such bulky groups enhances the internal conversion processes, and hence drastically reduces the fluorescence of the dye.<sup>[20]</sup> However, in these model dyes, the steric interaction with the flanking methyl groups seems to hinder, at least to some extent, the rotation of the phenyl ring.<sup>[19]</sup> In spite of this geometrical restriction, it seems that the phenyl group might have some rotational freedom, increasing the vibrational coupling with the BDP core, which could explain the slight decrease in the fluorescence of the model dyes.<sup>[18]</sup>

**Laser properties:** The lasing behavior of model dyes **3** and **6** was analyzed according to the following protocol. First, we carried out a systematic analysis of the laser action of the new dyes in the liquid phase to guide the selection of the best dye/host matrix combination among the quasi-unlimited compositions and structures of solid materials with a view to optimizing both the lasing efficiency and the photostability.

The dependence of the laser action on the concentration of the new BDP dyes was analyzed in ethyl acetate by varying the dye concentration while keeping the other experimental parameters constant. Under these experimental conditions, broad-line-width laser emission peaked at around 558 nm, with a pump threshold energy of about 0.8 mJ, a beam divergence of about 5 mrad, and a pulse duration of around 8 ns FWHM (full-width at half-maximum), was obtained from the new dyes when placed in a simple plane-plane non-tunable resonator.

Concentrations of  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  and  $6 \times 10^{-4} \text{ M}$  resulted in the highest lasing efficiencies (defined as the ratio between the energy of the dye laser output and the energy of the pump laser incident on the sample surface) for compounds **3** (61 %) and **6** (60 %), respectively. The actual effect of the solvent on the dye laser action was analyzed in solutions with concentrations set at the values that optimize the lasing action, using the same solvents that were selected to analyze the photophysical properties of the new dyes. In all of the selected solvents, the model dyes lased with high efficiency (Table 2), their performances exceeding those of the parent dye PM567 (35 %) and other 8-substituted BDP dyes when pumped under identical experimental conditions.<sup>[21]</sup>

Table 2. Laser properties<sup>[a]</sup> of the new 8-functionalized BDP dyes in the liquid phase.

Solvent	Compound <b>3</b>		Compound <b>5</b>		Compound <b>6</b>	
	Eff [%]	$\lambda_{\text{la}}$ [nm]	Eff [%]	$\lambda_{\text{la}}$ [nm]	Eff [%]	$\lambda_{\text{la}}$ [nm]
CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	57	558	47	558	58	558
MeOH	50	563	52	560	50	558
EtOH	52	562	51	562	56	560
EtOAc	61	558	61	560	60	558
acetone	50	559	50	561	52	557
cyclohexane	35	562	25	561	21	555

[a] Eff: energy conversion efficiency,  $\lambda_{\text{la}}$ : peak wavelength of the laser emission.

The new dyes proved to be highly photostable since, after 100 000 pump pulses at 10 Hz, compounds **3** and **6** retained 90 and 80 % of their initial laser outputs, respectively, which represents a significant improvement in useful lifetime compared with commercial PM567 as well as other 8-substituted BDP dyes when pumped under otherwise identical experimental conditions (Table 2 and Figure 2).<sup>[21]</sup> This enhancement may be related to a higher photochemical stabilization of the chromophores rather than to a decline in the nonradiative deactivation processes, since the new dyes have similar values of  $k_{\text{nr}}$  as the parent PM567. In addition, the lasing behavior of the new dyes showed good correlation with their photophysical properties in dilute solutions. Thus, the

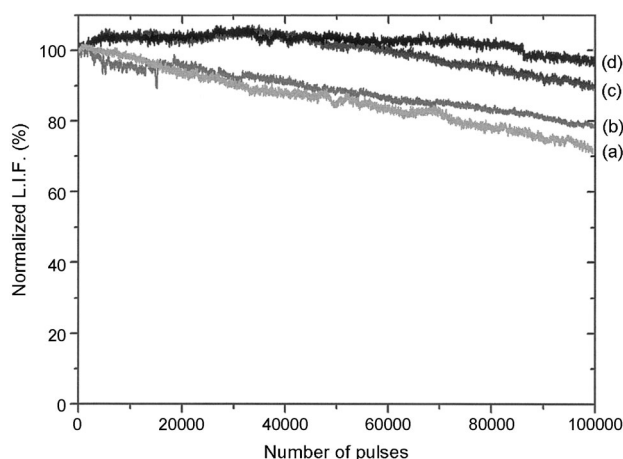


Figure 2. Normalized laser-induced fluorescence emission as a function of the number of pump pulses for PM567 (a), **6** (b), **3** (c), and **5** (d) dye solutions in ethyl acetate. The residual laser-induced fluorescence emissions after 100 000 pulses for (a) to (d) were 71.4, 78.8, 89.5, and 97.3 %, respectively. Pump energy and repetition rate: 5.5 mJ pulse<sup>-1</sup> and 10 Hz, respectively.

similarity between the photophysical properties was also manifested in similar laser behavior for both dyes. Looking at the dependence of the laser action of each new dye on the nature of the solvent, it can be appreciated that the higher the fluorescence quantum yield, the higher the lasing efficiency.

The laser action of the new BDP dyes **3** and **6** in the solid state was analyzed in samples synthesized with the dye concentration that induced the highest lasing efficiency in liquid solution ( $5 \times 10^{-4}$  to  $6 \times 10^{-4}$  M, depending on the dye). Methyl methacrylate (MMA) was chosen as the main monomeric component of the formulations because this ester mimics ethyl acetate, a solvent in which both model dyes display high lasing efficiencies.

First, compounds **3** and **6** were incorporated as true solutions into the solid homopolymer poly(methyl methacrylate) (PMMA), to delineate the effect of the 8-substituent on their lasing action when pumped under the experimental conditions described above. The results obtained are summarized in Table 3. No significant differences were observed in the wavelength of the maximum laser emission of each dye between their liquid and solid solutions. Lasing efficiencies of 40 and 38 %, respectively, were measured, which are lower than those obtained from the corresponding solutions in ethyl acetate, whereas the lasing photostability main-

tained similar values to those measured in the liquid phase. In this regard, it has to be taken into account that the surface finishes of the solid samples relevant to the laser operation were not laser-grade, which is more detrimental to laser efficiency than to laser photostability. To put the present results into perspective, the lasing parameters of PM567 in PMMA were also measured under the same conditions. The results obtained (a laser efficiency of 28 %, with the emission dropping to zero after 100 000 pump pulses)<sup>[22]</sup> were clearly inferior to those obtained for the new 8-functionalized BDP dyes.

The photophysical and lasing properties of the new model BDP dyes in solution indicated that a very polar protic solvent such as 2,2,2-trifluoroethanol would also be a good liquid medium for laser operation. To mimic this solvent, we selected the monomer 2,2,2-trifluoroethyl methacrylate (TFMA) for the preparation of linear copolymers with different proportions of MMA. The incorporation of the new dyes **3** and **6** into this fluorinated organic matrix did not improve their laser performances as compared with those obtained in pure PMMA homopolymer (Table 3). In fact, the presence of the fluorinated monomer in the matrix slightly decreased both the lasing efficiency and the photostability of the dyes. Although photobleaching of dyes can occur through several different mechanisms and, from a general point of view, can be considered to be quite complex, at low irradiances and under ambient atmosphere the primary photodegradation event of chromophores is believed to be photo-oxidation. As a result, factors that accelerate oxygen diffusion, such as the higher oxygen permeability of fluorinated materials, would be expected to reduce the photostability of the new model BDP dyes.

In summary, the two new analogues of dye PM567, compounds **3** and **6**, have demonstrated similar photophysical properties and higher lasing efficiencies and photostabilities than the parent dye PM567, both in the liquid phase and when incorporated into solid matrices. Therefore, the chosen models are suitable candidates to be linked to the POSS unit, since the unique photophysical properties of a BDP chromophore such as PM567 are preserved after the introduction of the alkynyl or 1,2,3-triazolyl substituents at the *para*-position of the phenyl ring. Furthermore, the attachment of the BDP unit to the POSS core is known to be an efficient means of photostabilizing BDP laser dyes.

#### Influence of the BDP-POSS click assembly—monosubstitution (compound **5**):

**Photophysical characterization:** The linkage of the BDP moiety to the POSS core (compound **5**) had only a minor effect on the spectral band positions and on the fluorescence lifetime, which remained close to those of the model BDP bearing the linking unit (compound **6**, Table 1). However, the absorption transition probability was more affected by the presence of POSS (the molar absorption decreased by around 25 %) than the fluorescence transition, since the fluorescence quantum yield decreased by only around 10 %

Table 3. Laser properties of the new photosensitized materials.

Material <sup>[a]</sup>	Compound <b>3</b>			Compound <b>5</b>			Compound <b>6</b>		
	Eff [%]	$\lambda_{la}$ [nm]	I [%]	Eff [%]	$\lambda_{la}$ [nm]	I [%]	Eff [%]	$\lambda_{la}$ [nm]	I [%]
A	40	560	97	52	560	100	38	559	77
B	36	560	82				31	558	72
C				56	558	100			

[a] A: PMMA; B: Co(MMA/TFMA, 70:30); C: Co(MMA/8MAPOSS, 87:13).

(Table 1). This behavior may be attributed to a reduction/enhancement of the radiative/nonradiative deactivation processes, respectively, explaining the maintenance of the fluorescence lifetime (Table 1). The reduction of the  $k_{\text{r}}$  values is correlated with the decrease in the absorption probability, while the enhancement of the  $k_{\text{nr}}$  values should be related to the large pendant POSS framework. A molecular structure with high conformational freedom increases the flexibility of the dye, thereby favoring internal conversion processes.<sup>[20]</sup> In any case, the resulting hybrid dye retained a high fluorescence capacity (up to 0.65, with lifetimes of around 4–6 ns; see Table S1 in the Supporting Information).

**Laser properties:** The laser action of the new hybrid dye **5** was evaluated following the protocol described above. Under the selected experimental conditions, a concentration of the new hybrid BDP dye of  $7.5 \times 10^{-4}$  M assured an optical density at the pumping wavelength (532 nm) similar to that selected for the characterization of the 8-functionalized BDP dyes **3** and **6**. The hybrid dye **5** lased at around 560 nm with an efficiency ranging from 60 % (ethyl acetate) to 25 % (cyclohexane), and showed high photostability with no sign of degradation in its laser output after 100 000 pump pulses at a repetition rate of 10 Hz (Table 2 and Figure 2). It should be noted that although the lasing performances of dyes **5** and **3** were similar, the absorption and fluorescence probabilities were lower for the hybrid dye. This fact can be related to our initial hypothesis: the POSS particles, with sizes below 5 nm, act as weak scattering centers in the Rayleigh limit (particle size much smaller than the emission wavelength), increasing the effective optical path inside the gain medium in a process known as non-resonant feedback (NRF) lasing, incoherently supplementing the conventional laser action in such a way as to increase the efficiency of the laser system.<sup>[8,23]</sup> Under laser irradiation, the opening up of this new non-resonant feedback pathway explains the high laser performance of the new BDP–POSS cluster, as well as the lack of correlation with its photophysical properties, which were recorded under much lower excitation intensities.

Incorporation of the new BDP–POSS dye into PMMA remarkably improved the laser action as compared to that recorded with dye **3** in the same matrix (material A, Table 3). Thus, for the hybrid dye, a laser efficiency as high as 52 % was recorded, without any sign of degradation after 100 000 pump laser pulses in the same position of the sample at a repetition rate of 10 Hz. The incorporation of methacryl-POSS nanoparticles (8MAPOSS cage mixture, Scheme 3) into this medium resulted in a further enhancement of the lasing performance. In this way, a new solid material based on a copolymer of MMA with a 13 % weight ratio of 8MAPOSS doped with hybrid dye **5** reached a lasing efficiency of up to 56 %, while maintaining a high photostability (material C, Table 3).

To better assess the laser photostability of the new hybrid BDP–POSS dye **5**, we proceeded to carry out a longer run of pumping under more drastic conditions by irradiating the

same position of the sample at a repetition rate of 30 Hz (Figure 3). The new hybrid dye dissolved in pure PMMA exhibited high photostability, without any sign of degradation

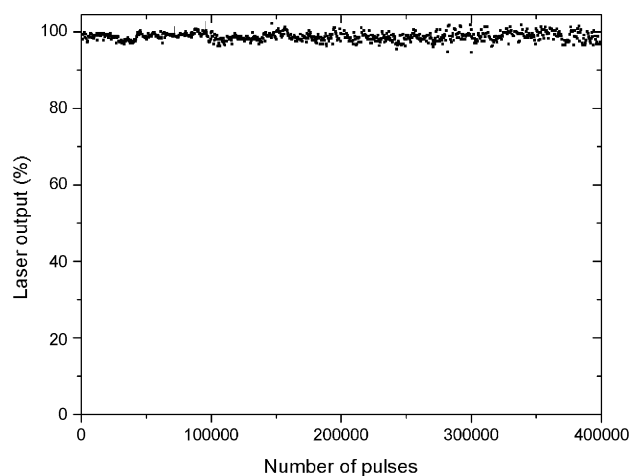


Figure 3. Normalized laser output as a function of the number of pump pulses in the same position of the sample for the new hybrid dye **5** incorporated into PMMA. Pump energy and repetition rate:  $5.5 \text{ mJ pulse}^{-1}$  and 30 Hz, respectively.

of its laser output after 400 000 pump pulses. Thus, regarding laser efficiency and photostability, the new hybrid BDP–POSS cluster improved our previous results based on hybrid matrices doped with the parent PM567 dye, even when these matrices were based on copolymers of MMA with different weight ratios of 8MAPOSS.<sup>[22,24]</sup>

#### Influence of the BDP–POSS click assembly—octa-substitution (compound **4**):

**Photophysical characterization:** This multichromophoric hybrid dye was found to be insoluble in apolar solvents, such that not even dilute ( $10^{-6}$  M) solutions could be obtained, but dissolved well in polar media such as acetone, ethyl acetate, and 2,2,2-trifluoroethanol. Figure 4 shows the corresponding absorption and fluorescence spectra, together with the fluorescence decay curves. The presence of eight BDP units in the same molecule led to a large increase in the absorption transition probability, with  $\epsilon_{\text{max}}$  being as high as  $38 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  in acetone (Table 1), probably the largest reported for a BDP-based system. The fluorescence properties of compound **4** depended on the nature of the solvent. Indeed, whereas in ethyl acetate the fluorescence quantum yield was high (0.62) and the decay curve could be interpreted as monoexponential with a lifetime of 5.4 ns, an increase in solvent polarity led to a loss of the fluorescence ability, most notably in trifluoroethanol (see Table S2 in the Supporting Information). In acetone, the decay curve became multiexponential, consisting of two components with lifetimes of 2.1 and 3.6 ns (Table 1), which could be assigned to different microenvironments of the BDP units in compound



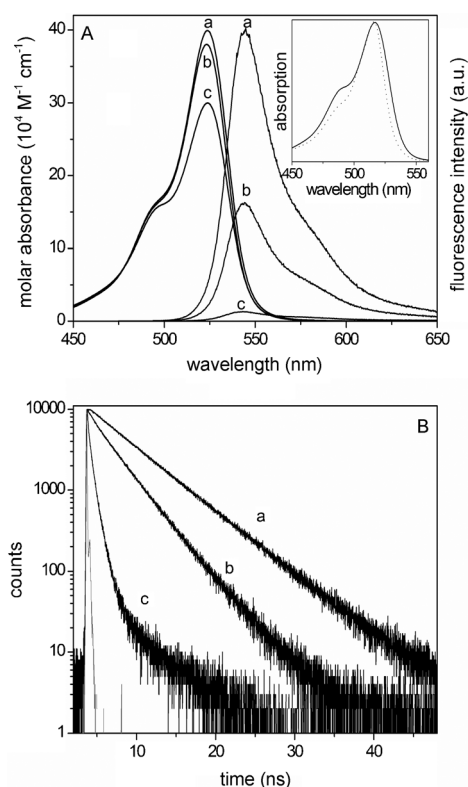


Figure 4. A) Absorption and fluorescence spectra of compound **4** scaled by its molar absorption and fluorescence quantum yields, respectively, in ethyl acetate (a), acetone (b), and trifluoroethanol (c). The normalized absorption spectra of PM567 (dashed) and compound **4** (solid) are also included. B) Fluorescence decay curves.

**4** (for instance, a chromophore surrounded by other BDP moieties or by solvent), and a third fast component (0.3 ns) due to a quenching process responsible for the decrease in the fluorescence quantum yield. In the most polar medium, the fluorescence emission was almost negligible and the decay curve was multiexponential and characterized by very short lifetimes.

To gain a deeper insight, we tried to simulate theoretically the most stable ground-state conformation of compound **4** by means of the AM1 semiempirical method. Taking into account the large number of possible conformations of this molecule, we followed two different approaches for the geometry optimization. On the one hand, a full optimization of the octasubstituted POSS was performed starting from a geometry with the BDP chromophores located as far as possible from each other and with the phenyl substituents oriented coplanar to the BDP system. On the other hand, we carried out a sequence of stepwise building of the molecule followed by full geometry optimization at each step starting from the bare octapropyl-POSS core, then adding the eight triazolyl rings and finally four of the eight phenyl-BDP substituents on one of the faces of the POSS cube, to ultimately obtain a simplified model of **4** in an energy-minimized conformation. One should keep in mind the difficulty in handling such large and flexible structures, with many allowed

conformations. In all cases, the final optimized geometry (Figure 5) revealed that the phenyl rings and their attached indacene subunits were not coplanar, as expected. Besides,

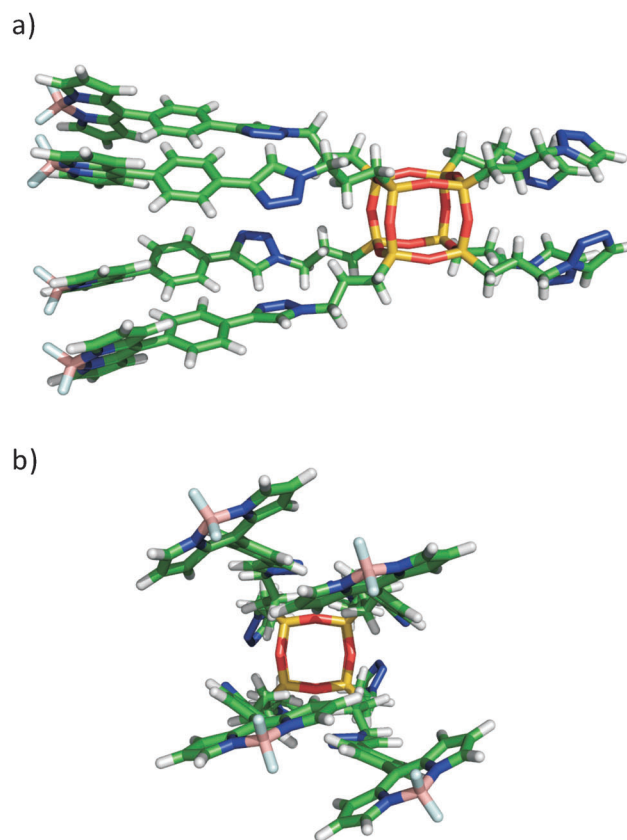


Figure 5. Optimized geometry (at AM1 semiempirical level) of a simplified model of compound **4** lacking four of the eight phenyl-BDP substituents: (a) front view; (b) side view.

the BDP chromophores did not occupy the available free volume, but rather tended to be in close contact, allowing through-space interactions between them. In fact, it was observed that the BDP units tended to be paired, with a cofacial arrangement (Figure 5), allowing a  $\pi$ - $\pi$  interaction and, consequently, the formation of H-type or “sandwich” aggregates, in which the transition moments of the chromophores are in a parallel arrangement.<sup>[25]</sup>

The self-association of the BDP chromophores was corroborated by other experimental findings. Comparison of the normalized absorption spectra of the octasubstituted POSS **4** and the parent PM567 dye indicated that the spectrum of the hybrid material was wider, with increased absorbance in the hypsochromic shoulder region, which is characteristic of H-type aggregates (Figure 4). Besides, the absorption probability of compound **4** does not correspond to the sum of eight BDP units (the  $\epsilon_{\text{max}}$  of model dye **6** was measured as  $8.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Table 1). We have pointed out previously that the linkage of the BDP unit to the POSS core (compound **5**) led to a slight reduction in the absorption transition probability.



Although BDP dyes usually have a low tendency to self-associate,<sup>[20c]</sup> some authors have claimed the presence of aggregates in confined environments or in multichromophoric dyes, in which the BDP cores are closely disposed through molecular bridges.<sup>[26]</sup> Owing to the hydrophobicity of the BDP dye, an increase in the polarity in the surrounding environment forces the chromophores into closer association, favoring dye aggregation. Indeed, the hypsochromic absorption shoulder was clearer and the calculated molar fraction of the aggregate was higher in polar solvents (trifluoroethanol). Quantum mechanical calculations suggest that in such an H-type dimer, the BDP monomeric units are mutually disposed with a dihedral angle of 8° between them and separated by 5 Å. However, due to the flexibility of the linking chains, the chromophores are not held tightly in a cofacial manner, which leads to a low exciton coupling and a low splitting of the absorption bands of the aggregate,<sup>[27]</sup> thus accounting for the only slight changes observed in the absorption spectrum of the octasubstituted POSS compared to that of the free BDP dye (Figure 4). Indeed, a rough estimate of the degree of aggregation<sup>[28]</sup> predicts a molar fraction of around 0.8 for the monomer and 0.10 for the dimer (0.20 for the monomeric units of the aggregate).

Aggregation is the main factor responsible for the decrease in the fluorescence ability and the short lifetime in polar media. Apart from the static fluorescence quenching induced by the H-type aggregates due to their inactive absorption in fluorescence, the multi-exponential decay in polar media was indicative of complex excited-state dynamics. Typically, non-fluorescent H-aggregates undergo deactivation of the monomer excited states by energy-transfer processes.<sup>[28]</sup> The formation of a fluorescent excimer is ruled out since the recorded fluorescence band resembled that of the model BDP dye, no new fluorescence bands were detected, and the deconvolution of the decay curves was the same regardless of the emission wavelength. Besides, the spatial proximity between the BDP units, as revealed in the optimized geometry of the octasubstituted POSS (Figure 5), could lead to extra quenching processes (i.e., interconversion between aggregates and monomers) producing an overall loss of fluorescence capacity due to the flexibility of the spacer connecting the BDP units to the POSS core, which could allow a range of different relative arrangements of the BDP units contributing to the loss of fluorescence.<sup>[21c]</sup> In this sense, the full optimization of compound **4** predicted a slight loss of planarity in the BDP chromophores, showing a butterfly-like distortion along the transversal axis, while in the monosubstituted POSS (compound **5**) the indacene core remained fully planar. This lack of planarity, probably due to the high steric hindrance of such a constrained structure in the octasubstituted POSS, should lead to an increase in the internal conversion probability.<sup>[29]</sup> In view of these results, the octasubstituted POSS **4** is deemed to be unsuitable for use as a dye laser.

**Laser properties:** Hybrid dye **4** did not lase even under drastic pumping conditions. Indeed, all of the abovementioned

nonradiative pathways, mainly due to the presence of aggregates, greatly enhanced the losses in the resonator cavity, preventing the detection of the laser signal.

## Conclusion

Octakis(3-azidopropyl)octasilsesquioxane (**2**) is a topologically ideal nano building block for the efficient synthesis of mono- and octa-functionalized fluorescent nanocages through CuAAC reaction with alkyne-substituted BDP dyes. The controlled monofunctionalization of octa-azide **2** with BDP dye **3** resulted in a fluorescently labeled POSS derivative **5** containing seven additional reactive azide groups suitably predisposed for further functionalization through CuAAC with any molecule of interest having a terminal alkynyl group. Full dye-substitution of POSS afforded a hybrid system characterized by low fluorescence ability, mainly in polar media. Quantum mechanical simulation has provided a molecular basis that allows insight into the composition–structure–properties relationship of these hybrid systems. The optimized molecular geometry suggests that the BDP chromophores tend to be paired, leading to aggregation, which effectively quenches both fluorescence and laser emissions. However, the linkage of one BDP unit to the POSS core had only a minor effect on the photophysics of the dye, while significantly improving the laser properties of the final system with respect to those exhibited by the model dyes. In fact, the new hybrid dye exhibited lasing efficiencies of up to 60% (in the liquid phase) and 56% (in solid matrices), with high photostability, since the laser output remained at its initial value under very demanding pumping conditions ( $4 \times 10^5$  pump pulses in the same position of the sample at 30 Hz repetition rate). The new BDP–POSS cluster gives rise to a non-resonant feedback mechanism, which enhances its coherent laser performance. The versatility in the synthesis of the hybrid systems based on dye-linked POSS nanoparticles, together with their improved optical properties and their nanofabrication capability, opens up the possibility of using these new photonic materials as alternative sources for optoelectronic devices, competing with dendronized or grafted polymers.

## Experimental Section

**General methods for synthesis and chemical characterization:** All melting points were measured with a Reicher Jung Thermovar micro-melting apparatus. Proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR) spectra were recorded on a Bruker AMX-300 (300 and 75 MHz, respectively), a Varian INOVA 300 (300 and 75 MHz, respectively), or a Varian INOVA 400 (400 and 100 MHz, respectively) spectrometer. Silicon-29 nuclear magnetic resonance spectra were measured on a Varian INOVA 400 spectrometer (79.5 MHz). Chemical shifts are expressed in parts per million ( $\delta$  scale) downfield from tetramethylsilane and are referenced to residual peaks of the deuterated NMR solvent used or to internal tetramethylsilane. Data are presented as follows: chemical shift, multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, m= multiplet and/or multiple resonances, br=broad), integration, coupling con-

stants in hertz (Hz), and assignment. Proton and carbon-13 assignments are based on DQ-COSY, HSQC, and HMBC correlation experiments. Thin-layer chromatography (TLC) was performed with Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> plates and Merck aluminum oxide neutral 60 F<sub>254</sub> plates. Chromatograms were visualized using UV light of wavelengths 254/365 nm. For the detection of azides, the chromatograms were first dipped in a 1% (w/v) solution of Ph<sub>3</sub>P in EtOAc, dried at RT, then dipped in a 1% or 5% (w/v) solution of ninhydrin in 95% aqueous EtOH, and finally charred on a hot plate.<sup>[30]</sup> Column chromatography was performed with Merck neutral aluminum oxide or Merck silica gel, grade 60, 230–400 mesh. Mass spectra were recorded on a MALDI Voyager-DE PRO time-of-flight (TOF) spectrometer (Applied Biosystems), using a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix, or on an Agilent/HP 1100 LC/MSD spectrometer using ESI or APCI sources. Anhydrous solvents were prepared according to standard methods by distillation over drying agents or by elution through a Pure Solv column-drying system<sup>[31]</sup> from Innovative Technology. All other solvents were of HPLC grade and were used as received. All reactions were carried out under magnetic stirring and, if air- or moisture-sensitive, in oven-dried glassware under argon. Microwave irradiation experiments were performed with a single-mode Discover System from CEM Corporation, using standard Pyrex tubes (10 or 35 mL capacity) sealed with a rubber cap.

**Materials:** Pyrromethene 567 (laser grade, Exciton) with a purity >99% (checked by spectroscopic and chromatographic methods) was used as received. Solvents for laser studies were of spectroscopic grade (Merck, Aldrich, or Sigma) and were used without purification. Linear and cross-linked copolymers were obtained by copolymerization of methyl methacrylate (MMA) with different volumetric proportions of the monofunctional fluorinated monomer 2,2,2-trifluoroethyl methacrylate (TFMA) and of methacryl-POSS (8MAPOSS cage mixture, from Hybrid Plastics). All monomers were purchased from Aldrich. MMA was purified before use, while TFMA and 8MAPOSS were used as received. 2,2'-Azobis(isobutyronitrile) (AIBN) (Acros) was used as a thermal initiator of polymerization. Azido-POSS **2** was prepared as described previously.<sup>[11]</sup> Copper(I) catalyst [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br (C18<sub>6</sub>tren = tris(2-dioctadecylaminoethyl)amine) was prepared according to described procedures.<sup>[16a]</sup>

**Compound 4:** A solution of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2.5 mg, 0.010 mmol) and sodium ascorbate (9 mg, 0.045 mmol) in water (0.6 mL) was added to a solution of azido-POSS **2** (20 mg, 0.018 mmol) and 4,4-difluoro-8-(4'-ethynylphenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**3**)<sup>[32]</sup> (72 mg, 0.178 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.9 mL). After stirring for 4.5 h at RT, a saturated aqueous solution of EDTA (1 mL) was added, the mixture was vigorously stirred for 30 min, the phases were separated, and the aqueous layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 3 mL). The organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography (hexane/EtOAc, 1:5) to afford **4** (54 mg, 70%) as a red powder. M.p. (from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 290 °C (decomposition). *R*<sub>f</sub> = 0.75 (hexane/EtOAc, 1:5); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.68–0.75 (m, 16H; Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.93 (t, 48H, *J* = 7.4 Hz; 16 × CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.30 (s, 48H; 16 × CH<sub>3</sub>-C), 2.13–2.18 (m, 16H; SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.25 (q, 32H, *J* = 7.4 Hz; 16 × CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.51 (s, 48H; 16 × CH<sub>3</sub>-C), 4.46 (t, 16H, *J* = 6.9 Hz; SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 7.32 (d, 16H, *J*<sub>AB</sub> = 8.2 Hz; 2 × CH Ar), 8.01 (d, 16H, *J*<sub>AB</sub> = 8.2 Hz; 2 × CH Ar), 8.15 ppm (s, 8H; 1,2,3-triazole); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 11.9 (CH<sub>3</sub>), 12.5 (CH<sub>3</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.0 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 24.1 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 120.7 (CH in 1,2,3-triazole), 126.1 (CH phenyl), 129.0 (CH phenyl), 130.1, 131.2, 133.1, 135.8, 137.9, 139.2 (C in 1,2,3-triazole), 147.1, 154.0 ppm; <sup>29</sup>Si NMR (79.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = −67.1 ppm; UV/Vis (EtOAc): λ<sub>max</sub> = 523 nm, ε = 432 362 mol<sup>−1</sup> m<sup>3</sup> cm<sup>−1</sup>; MALDI-TOF (2,5-dihydroxybenzoic acid matrix): *m/z*: 4304 [*M* − F]<sup>+</sup>.

**Mono-BDP-POSS 5:** [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br (2.2 mg, 0.001 mmol) and *i*Pr<sub>2</sub>NEt (6.5 μL, 0.037 mmol) were added to a solution of azido-POSS **2** (134 mg, 0.123 mmol) and 4,4-difluoro-8-(4'-ethynylphenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**3**) (5 mg, 0.012 mmol) in toluene (1 mL) under argon. The mixture was stirred for 6 h at 80 °C under microwave irradiation. The solvent was then removed under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatog-

raphy (SiO<sub>2</sub>; hexane/EtOAc, 12:1 to 5:3) to recover excess starting material **2** (113 mg, 94% recovery of excess **2** employed) and **5** as a red viscous oil (15.1 mg, 82%). *R*<sub>f</sub> = 0.61 (hexane/EtOAc, 5:3); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.71–0.76 (m, 14H; Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.83–0.98 (m, 2H; Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.97 (t, 6H, *J* = 7.55 Hz; CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.34 (s, 6H; CH<sub>3</sub>-C1, CH<sub>3</sub>-C7), 1.66–1.74 (m, 14H; SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.06–2.13 (m, 2H; Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.30 (q, 4H, *J* = 7.51 Hz; CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 6H; CH<sub>3</sub>-C3, CH<sub>3</sub>-C5), 3.26 (td, 14H, *J* = 6.83, 1.42 Hz; CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 4.43 (t, 2H, *J* = 7.11 Hz; CH<sub>2</sub>-N=N), 7.36 (d, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 8.43 Hz; 2 × CH phenyl), 7.97 (d, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 8.43 Hz; 2 × CH phenyl), 7.86 ppm (s, 1H; 1,2,3-triazole); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 12.6 (CH<sub>3</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>), 14.9 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 17.3 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 22.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 24.4 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.8 (CH<sub>2</sub>-N=N), 53.5 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 120.1 (CH, 1,2,3-triazole), 126.4 (CH, phenyl), 129.2 (CH, phenyl), 130.9, 131.3, 133.0, 135.9, 138.5, 139.8 (C in 1,2,3-triazole), 147.4, 154.1 ppm [Si\* = silicon atom with the (1,2,3-triazol-1-yl)propyl substituent]; <sup>29</sup>Si NMR: δ = −66.92, −66.97, −67.53 ppm (3:4:1 relative intensities); UV/Vis (EtOAc): λ<sub>max</sub> = 523 nm (ε = 47 427 mol<sup>−1</sup> m<sup>3</sup> cm<sup>−1</sup>); MS (API-ESI): *m/z*: 1493.3 [*M* + H]<sup>+</sup>, 1475.4 [*M* − NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

**BDP dye 6:** a) Synthesis of 1-butylazide: A solution of 1-bromobutane (1.0 g, 7.5 mmol) and NaN<sub>3</sub> (950 mg, 14.6 mmol) in DMF (15 mL) was stirred for 15 h at 120 °C. The mixture was then poured into water and extracted three times with toluene (final concentration 0.04 M assuming the reaction to be quantitative), and the combined extracts were dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and used without further purification. b) CuAAC reaction: [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br (11 mg, 0.006 mmol) and *i*Pr<sub>2</sub>NEt (32 μL, 0.185 mmol) were added to a solution of 1-butylazide in toluene (2.23 mL, 0.04 M, 0.080 mmol) containing 4,4-difluoro-8-(4'-ethynylphenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**3**) (25 mg, 0.062 mmol) under argon. After stirring for 3 h at 80 °C under microwave irradiation, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (hexane/EtOAc, 1:5) to afford **6** as a red crystalline powder (28 mg, 90%). *R*<sub>f</sub> = 0.44 (hexane/EtOAc, 5:3); m.p. (from EtOAc): 232–235 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.98 (t, 6H, *J* = 7.5 Hz; CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.00 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz; CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 1.34 (s, 6H; CH<sub>3</sub>-C1, CH<sub>3</sub>-C7), 1.37–1.49 (m, 2H; CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 1.88–2.04 (m, 2H; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.31 (q, 4H, *J* = 7.5 Hz; CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 6H; CH<sub>3</sub>-C3, CH<sub>3</sub>-C5), 4.44 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz; CH<sub>2</sub>N), 7.35 (d, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 8.3 Hz; CH phenyl), 7.84 (s, 1H; 1,2,3-triazole), 7.97 ppm (d, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 8.3 Hz; CH phenyl); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 12.1 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>-C1, CH<sub>3</sub>-C7), 13.7 (CH<sub>3</sub>-C3, CH<sub>3</sub>-C5), 14.8 (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 17.2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 19.9 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 32.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 50.4 (CH<sub>2</sub>N), 119.9 (CH in 1,2,3-triazole), 126.4 (CH phenyl), 129.0 (CH phenyl), 130.9, 131.4, 133.0, 135.7, 138.5, 139.9, 147.2, 153.9 ppm; UV/Vis (EtOAc): λ<sub>max</sub> (ε) = 522 nm (108 900 mol<sup>−1</sup> m<sup>3</sup> cm<sup>−1</sup>); MS (API-ESI): *m/z*: 504.3 [*M*]<sup>+</sup>.

**Preparation of solid polymeric samples:** The new BDP derivatives were incorporated into different solid matrices according to a previously described procedure.<sup>[33]</sup> Solid monolith laser samples were cast in cylindrical shape so as to form rods of 10 mm in diameter and 10 mm in length. A cut was made parallel to the axis of the cylinder to obtain a lateral flat surface of ≈ 6 × 10 mm. This surface, as well as the ends of the laser rods, was prepared for lasing experiments by using a grinding and polishing machine (Phoenix Beta 4000, Buehler) until an optical-grade finish was obtained. The planar grinding stage was carried out with Texmet 1000 sandpaper (Buehler) using a diamond polishing compound of 6 μm as an abrasive in mineral oil as a lubricant. The final polishing stage was realized with a G-Tuch Microcloth (Buehler), using a Mastertex cloth disk (Buehler) with diamond of 1 μm in mineral oil as an abrasive.

**Photophysical properties:** Photophysical properties were measured from dilute solutions of the dyes (around 2 × 10<sup>−6</sup> M), prepared by adding the corresponding solvent to the residue from an appropriate amount of a concentrated stock solution in acetone, after vacuum evaporation of this solvent. UV/Vis absorption and fluorescence spectra were recorded on a Cary 4E spectrophotometer and on a SPEX Fluorolog 3–22 spectrofluorimeter, respectively. Fluorescence quantum yields (φ) were evaluated from corrected spectra, using a diluted solution of PM567 dye (Exciton, laser grade) (φ = 0.91 in methanol) as a reference.<sup>[17]</sup> Radiative decay curves were recorded by the time-correlated single-photon counting tech-

nique (Edinburgh Instruments, model FL920). Fluorescence emission was monitored at the maximum emission wavelength after excitation at 470 nm by means of a diode laser (PicoQuant, model LDH470) with 150 ps FWHM pulses. The fluorescence lifetime ( $\tau$ ) was obtained after deconvolution of the instrumental response signal from the recorded decay curves by means of an iterative method. The goodness of the exponential fit was assessed by statistical parameters (chi-squared, Durbin–Watson, and analysis of the residuals). The rate constants of radiative ( $k_{\text{r}}$ ) and nonradiative ( $k_{\text{nr}}$ ) deactivation were calculated according to  $k_{\text{r}} = \phi/\tau$  and  $k_{\text{nr}} = (1 - \phi)/\tau$ , respectively.

The ground-state geometries of the BDP–POSS hybrid dyes in the gas phase were fully optimized by the semiempirical AM1 method implemented in the Gaussian 09 software, compiled in an informatic cluster.

**Lasing properties:** Liquid solutions of dyes were contained in 1 cm optical-path quartz cells that were carefully sealed to avoid solvent evaporation during experiments. Both the liquid cells and the solid samples were transversely pumped at 532 nm with 5.5 mJ, 6 ns FWHM pulses from a frequency-doubled, Q-switched Nd:YAG laser (Monocrom OPL-10) at a repetition rate of up to 10 Hz. Most representative samples were also pumped at 30 Hz with 3.5 mJ, 10 ns FWHM pulses from a diode-pumped, frequency-doubled, Q-switched Nd:YAG laser (Monocrom HALAZEN 532–12). Details of the experimental system can be found elsewhere.<sup>[24]</sup>

The photostability of each dye in the liquid phase was also evaluated under experimental conditions identical to those selected to irradiate the fluorophores embedded in solid polymeric matrices, to allow later comparison of their stabilities in the liquid and solid phases under laser irradiation. Because the irradiated volume in solid samples was estimated to be 10  $\mu\text{L}$ , capillary tubes charged with solutions of the dyes in ethyl acetate offered the best geometry to reproduce the volume irradiated in the solid samples, maintaining the same laser pump conditions in both cases. Although the low optical quality of the capillary prevented laser emission from the dyes, information about photostabilities could be obtained by monitoring the decrease in laser-induced fluorescence intensity under excitation transverse to the capillary as a function of the number of pump pulses at 10 Hz repetition rate. The fluorescence emission was monitored perpendicular to the exciting beam, and its collection and analysis was carried out with the same set-up selected to characterize the laser emission from dyes incorporated into solid samples.

## Acknowledgements

We thank the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (projects MAT2007-65778-C02-01, MAT2007-65778-C02-02, TRACE2009-0144, CTQ-2006-15515-C02, CTQ2009-14551-C02-02, MAT2010-20646-C04-01, MAT2010-20646-C04-03, and MAT2010-20646-C04-04), the Comunidad de Madrid (project S2009/PPQ-1634 “AVANCAT”), and Gobierno Vasco (IT339-10) for financial support. We also thank the Ministerio de Ciencia e Innovación for an FPU predoctoral fellowship to B.T. and the C.S.I.C. for a JAE-PREDOC fellowship to M.E.P.-O. The SGI/IZO-SGIker UPV/EHU is gratefully thanked for allocation of computational resources.

- [1] For pioneering reports on POSS, see: a) D. W. Scott, *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68, 356–358; b) A. J. Barry, W. H. Daudt, J. J. Domicone, J. W. Gilkey, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 4248–4252; for reviews, see: c) R. M. Laine, M. F. Roll, *Macromolecules* **2011**, 44, 1073–1109; d) D. B. Cordes, P. D. Lickiss, F. Rataboul, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2081–2173; e) P. D. Lickiss, F. Rataboul, *Adv. Organomet. Chem.* **2008**, 57, 1–116; f) M. G. Voronkov, V. I. Lavrent'yev, *Top. Curr. Chem.* **1982**, 102, 199–236.
- [2] For a recent review, see: a) K. L. Chan, P. Sonar, A. Sellinger, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 9103–9120; for recent work in this field, see: b) M. F. Roll, J. W. Kampf, R. M. Laine, *Macromolecules* **2011**, 44, 3425–3435; c) X. Yang, J. D. Froehlich, H. S. Chae, B. T. Harding, S. Li, A. Mochizuki, G. E. Jabbour, *Chem. Mater.* **2010**, 22, 4776–4782; d) N. R. Vautravers, P. Andre, A. M. Z. Slawin, D. J. Cole-Hamilton,

- Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 717–724; e) S. Sulaiman, A. Bhaskar, J. Zhang, R. Guda, T. Goodson III, R. M. Laine, *Chem. Mater.* **2008**, 20, 5563–5573; f) M. F. Roll, M. Z. Asuncion, J. Kampf, R. M. Laine, *ACS Nano* **2008**, 2, 320–326; g) M. Y. Lo, C. Zhen, M. Lauters, G. E. Jabbour, A. Sellinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5808–5809; h) J. D. Froehlich, R. Young, T. Nakamura, Y. Ohmori, S. Li, A. Mochizuki, M. Lauters, G. E. Jabbour, *Chem. Mater.* **2007**, 19, 4991–4997.
- [3] a) E. Markovic, S. Clarke, J. Matison, G. P. Simon, *Macromolecules* **2008**, 41, 1685–1692; b) C. Zhao, X. Yang, X. Wu, X. Liu, X. Wang, L. Lu, *Polym. Bull.* **2008**, 60, 495–505.
- [4] S. Bizet, J. Galy, J. F. Gerard, *Macromolecules* **2006**, 39, 2574–2583.
- [5] a) L. Zheng, A. J. Waddon, R. J. Farris, E. B. Coughlin, *Macromolecules* **2002**, 35, 2375–2379; b) E. T. Kopesky, T. S. Haddad, R. E. Cohen, G. H. McKinley, *Macromolecules* **2004**, 37, 8992–9004; c) K. Y. Pu, B. Zhang, Z. Ma, P. Wang, X. Y. Qi, R. F. Chen, L. H. Wang, Q.-L. Fan, W. Huang, *Polymer* **2006**, 47, 1970–1978.
- [6] S. Bizet, J. Galy, J. F. Gerard, *Polymer* **2006**, 47, 8219–8227.
- [7] O. García, R. Sastre, I. García-Moreno, V. Martin, A. Costela, *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 14710–14713.
- [8] A. Costela, I. García-Moreno, L. Cerdan, V. Martin, O. Garcia, R. Sastre, *Adv. Mater.* **2009**, 21, 4163–4166.
- [9] S. Takeda, M. Obara, *Appl. Phys. B* **2009**, 94, 443–450.
- [10] a) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891–4932; b) R. Ziessel, G. Ulrich, A. Harriman, *New J. Chem.* **2007**, 31, 496–501; c) F. L. Arbeloa, J. Banuelos, V. Martinez, T. Arbeloa, I. L. Arbeloa, *Trends Phys. Chem.* **2008**, 13, 101–122; d) G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 1202–1219; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1184–1201; e) A. C. Benniston, G. Copley, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 4124–4131.
- [11] B. Trastoy, M. E. Pérez-Ojeda, R. Sastre, J. L. Chiara, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 3833–3841.
- [12] a) J. R. Suárez, B. Trastoy, M. E. Pérez-Ojeda, R. Marín Barrios, J. L. Chiara, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 2515–2520; for an earlier example of a primary amine to azide transformation using this reagent, see: b) S. Yekta, V. Prisyazhnyuk, H.-U. Reissig, *Synlett* **2007**, 2069–2072; for the synthesis and stability of  $\text{NfN}_3$ , see ref. [11] and the following: c) N. D. Volkov, V. P. Nazaretyan, L. M. Yagupol'skii, *Zh. Org. Khim.* **1982**, 18, 519–525; d) S. Zhu, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6503–6504; e) S.-Z. Zhu, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 2077–2081.
- [13] E. Rikowski, H. C. Marsmann, *Polyhedron* **1997**, 16, 3357–3361.
- [14] For recent alternative routes to **2** by nucleophilic substitution with concomitant partial cage rearrangements, see: a) Z. Ge, D. Wang, Y. Zhou, H. Liu, S. Liu, *Macromolecules* **2009**, 42, 2903–2910; b) V. Ervithayasuporn, X. Wang, Y. Kawakami, *Chem. Commun.* **2009**, 5130–5132; for improved conditions that largely avoid cage rearrangements, see: c) S. Fabritz, D. Heyl, V. Bagutski, M. Empting, E. Rikowski, H. Frauendorf, I. Balog, W.-D. Fessner, J. J. Schneider, O. Avrutina, H. Kolmar, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2212–2218; d) D. Heyl, E. Rikowski, R. C. Hoffmann, J. J. Schneider, W.-D. Fessner, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 5544–5548.
- [15] For pioneering reports on CuAAC reactions, see: a) C. W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599; for a comprehensive review, see: M. Meldal, C. W. Tornoe, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952–3015.
- [16] a) G. Barré, D. Taton, D. Lastecoueres, J.-M. Vincent, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7764–7765; b) N. Candelon, D. Lastecoueres, A. K. Diallo, J. Ruiz Aranzas, D. Astruc, J.-M. Vincent, *Chem. Commun.* **2008**, 741–743.
- [17] F. López Arbeloa, T. López Arbeloa, I. López Arbeloa, I. García-Moreno, A. Costela, R. Sastre, F. Amat-Guerri, *Chem. Phys.* **1998**, 236, 331–341.
- [18] J. Bañuelos Prieto, F. López Arbeloa, V. Martínez Martínez, T. Arbeloa López, F. Amat-Guerri, M. Liras, I. López Arbeloa, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 385, 29–35.

- [19] a) S. Mula, A. K. Ray, M. Banerjee, T. Chaudhuri, K. Dasgupta, S. Chattopadhyay, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2146–2154; b) Q. Zheng, G. Xu, P. N. Prasad, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5812–5819; c) T. T. Vu, S. Badré, C. Dumas-Verdes, J.-J. Vachon, C. Julien, P. Audebert, E. Y. Senotrusova, E. Y. Schmidt, B. A. Trofimov, R. B. Pansu, G. Clavier, R. Méallet-Renault, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 11844–11855.
- [20] a) A. Burghart, H. Kim, M. B. Welch, L. H. Thoresen, J. Reibenspies, K. Burgess, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7813–7819; b) M. A. H. Alamiry, A. C. Benniston, G. Copley, K. J. Elliot, A. Harriman, B. Stewart, Y.-G. Zhi, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4024–4032; c) F. López-Arbeloa, J. Bañuelos, V. Martínez, T. Arbeloa, I. López-Arbeloa, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2005**, *24*, 339–374.
- [21] a) F. López-Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, I. López-Arbeloa, A. Costela, I. García-Moreno, C. Gómez, F. Amat-Guerri, M. Liras, R. Sastre, *Photochem. Photobiol.* **2003**, *78*, 30–36; b) I. García-Moreno, A. Costela, L. Campo, R. Sastre, F. Amat-Guerri, M. Liras, F. López-Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, I. López-Arbeloa, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 3315–3323; c) M. Álvarez, A. Costela, I. García-Moreno, F. Amat-Guerri, M. Liras, R. Sastre, F. López-Arbeloa, J. Bañuelos Prieto, I. López-Arbeloa, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 802–813.
- [22] R. Sastre, V. Martín, L. Garrido, J. L. Chiara, B. Trastoy, O. García, A. Costela, I. García-Moreno, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3307–3316.
- [23] L. Cerdán, A. Costela, I. García-Moreno, O. García, R. Sastre, *Opt. Express* **2010**, *18*, 10247–10256.
- [24] A. Costela, I. García-Moreno, D. del Agua, O. García, R. Sastre, *J. Appl. Phys.* **2007**, *101*, 073110–073120.
- [25] a) E. G. McRae, M. Kasha, *Physical Processes in Radiation Biology*, Academic Press, New York, **1964**; b) J. E. Selwyn, J. I. Steinfeld, *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 762–774.
- [26] a) F. Bergström, I. Mikhalyov, P. Hagglöf, R. Wortmann, T. Ny, L. B.-A. Johansson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 196–204; b) D. Tleugabulova, Z. Zhang, J. D. Brennan, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 13133–13138; c) M. Bröring, R. Krüger, S. Link, C. Kleeberg, S. Köhler, X. Xie, B. Ventura, L. Flamigni, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2976–2983.
- [27] A. C. Benniston, G. Copley, A. Harriman, D. Howgegeo, R. W. Harrington, W. Clegg, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2018–2027.
- [28] I. López-Arbeloa, *J. Chem. Soc.* **1981**, *77*, 1725–1733.
- [29] K. H. Drexhage, in *Dye Lasers* (Ed.: F. P. Schäfer), Springer, Berlin, **1990**, Chapter 5, pp. 155–200.
- [30] S. Punna, M. G. Finn, *Synlett* **2004**, 99–100.
- [31] A. B. Pangborn, M. A. Giardello, R. H. Grubbs, R. K. Rosen, F. J. Timmers, *Organometallics* **1996**, *15*, 1518–1520.
- [32] a) G. Ulrich, R. Ziessel, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2070–2083; b) V. A. Azov, A. Schlegel, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4711–4715; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4635–4638.
- [33] M. Álvarez, F. Amat-Guerri, A. Costela, I. García-Moreno, C. Gómez, M. Liras, R. Sastre, *Appl. Phys. B* **2005**, *80*, 993–1006.

Received: February 15, 2011

Revised: July 21, 2011

Published online: October 20, 2011

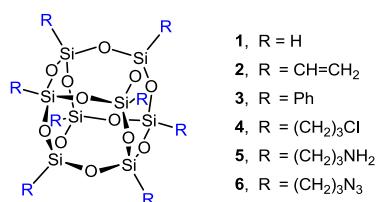
### ***Capítulo 3***

*Síntesis controlada de derivados hetero-  
bifuncionales de POSS.*

### 3.1 Introducción

La llamada aproximación “bottom-up” para la construcción modular de nanomateriales mono-, bi- y tridimensionales con un control preciso a nivel molecular en la escala nanométrica es de gran relevancia para la modificación dirigida de sus propiedades macroscópicas. Para este fin, es importante disponer de una metodología sencilla y escalable que nos permita acceder a una serie de nanobloques de construcción estructuralmente bien definidos y homogéneos en los que podamos introducir una diversidad de grupos funcionales que nos permitan a su vez llevar a cabo reacciones químicas altamente eficientes (idealmente de tipo “click”)<sup>[1]</sup> para su posterior funcionalización.

En las últimas dos décadas, los oligosilsesquioxanos poliédricos (POSS)<sup>[2]</sup> se han convertido en un grupo de compuestos de importancia creciente como nanobloques de construcción tridimensionales para la preparación de una gran variedad de materiales híbridos funcionales.<sup>[3]</sup> Los POSS más prometedores son los altamente simétricos, especialmente el que presenta el armazón con topología cúbica ( $T_8$ ), con fórmula molecular  $(RSiO_{1.5})_8$  y un tamaño de caja de 0.5-0.7 nm.<sup>[2a]</sup> Los POSS cúbicos más comunes son los homo-octafuncionalizados. Entre éstos, el octahidrido-octasilsesquioxano (**1**),<sup>[4]</sup> el más simple, junto con octavinilo-octasilsesquioxano (**2**),<sup>[5]</sup> octafenilo-octasilsesquioxano (**3**),<sup>[5f, 6]</sup> octakis(3-cloropropil)-octasilsesquioxano (**4**),<sup>[7]</sup> y octakis(3-aminopropil)-octasilsesquioxano (**5**)<sup>[8]</sup> (Esquema 3.1) han sido los precursores más empleados para la preparación de diferentes monómeros  $T_8$  y materiales derivados. Sin embargo, la derivatización de la caja de POSS que conlleve la introducción de varios grupos funcionales en la misma, puede proporcionar una diversidad aún mayor ampliando su posible aplicación en materiales polimerizables,<sup>[3d, e]</sup> grafting,<sup>[3d]</sup> modificaciones y anclajes superficiales,<sup>[3d]</sup> bioconjugación,<sup>[9]</sup> y otras transformaciones de gran utilidad.



Esquema 3.1 POSS homo-octafuncionalizados.

Los silsesquioxanos provistos de dos grupos orgánicos diferentes (POSS hetero-bifuncionales)<sup>[10]</sup> son la clase más simple de estos derivados multifuncionales y posiblemente también los más útiles. Sin embargo hay pocos ejemplos descritos que permitan la

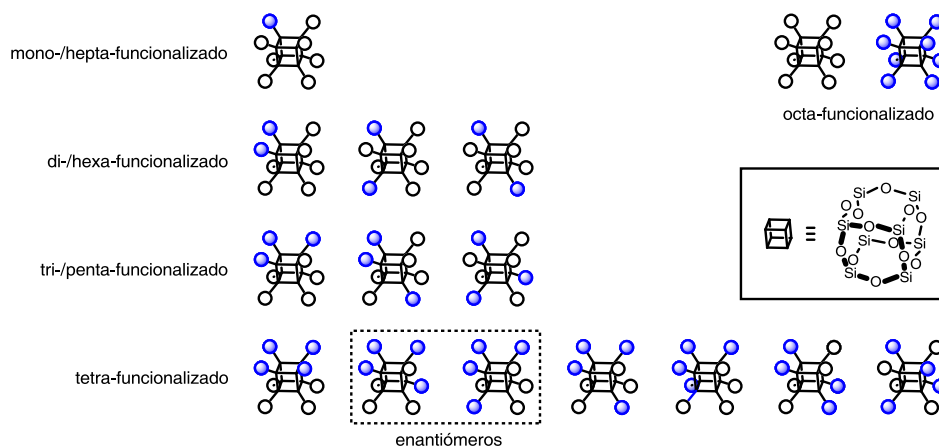
derivatización independiente de ambas funcionalidades. Por ejemplo, la funcionalización simultánea de la jaula de POSS con un elemento de biorreconocimiento (un grupo peptídico, un ácido nucleico, o un epítipo sacarídico) y una molécula "activa", tal como un colorante fluorescente, una sonda para imagen por resonancia magnética, un fármaco u otras moléculas funcionales, es de gran interés para potenciales aplicaciones en bioimagen, vectorización, transporte y liberación controlada de fármacos, o para el estudio de los receptores biológicos.<sup>[9]</sup>

<sup>11)</sup> La preparación de partículas de tipo Janus basadas en POSS es también una aplicación muy prometedora que se ha venido persiguiendo en los últimos años.<sup>[12],[13]</sup>

Se han descrito cinco estrategias diferentes en la bibliografía para la preparación de POSS hetero-bifuncionales:

- 1) Condensación co-hidrolítica directa de mezclas de varios monómeros organosilícicos distintos.<sup>[14],[15]</sup>
- 2) Reorganización de las jaulas de varios POSS distintos mezclados inducida por nucleófilos.<sup>[16]</sup>
- 3) Condensación cruzada de dos tetraol-tetrasiloxanos cíclicos distintos (silsesquioxanos de estructura "medio-cubo").<sup>[12b, 17]</sup>
- 4) "Corner-capping" (o adición de una esquina esquina del cubo de POSS) de silsesquioxanos que están condensados de forma incompleta quedando una esquina "abierta" en forma de trisilanol de modo que pueda condensar con un nuevo trihalosilano.<sup>[11f], [18],[19]</sup>
- 5) Funcionalización parcial de derivados homo-octafuncionales de POSS como los del Esquema 1.<sup>[4d],[7g], [20]</sup>

Sin embargo, la mayoría de los ejemplos preparados por estas rutas contienen grupos alquilo o arilo simples como uno de los dos grupos funcionales y, por lo tanto, no son susceptibles de ser modificados fácilmente con posterioridad sin comprometer la integridad de la jaula inorgánica y/o la funcionalidad orgánica que le acompaña, lo que limita considerablemente sus posibles aplicaciones. Este es el caso en general de la ruta de "corner-capping". Además, con la única excepción de esta ruta y de algunos casos particulares de POSS mono-<sup>[20c]</sup> y di-funcionalizados,<sup>[20e, 21]</sup> se obtienen generalmente mezclas estadísticas de cajas multi-funcionalizadas y sus diversos isómeros estructurales (Figura 3.1) que son difíciles de separar.<sup>[15a, b, 20h, 20n]</sup> Por lo tanto, la síntesis selectiva de POSS bifuncionales con patrones de sustitución bien definidos es compleja y supone todavía, a pesar de los progresos más recientes, un desafío aún sin resolver.



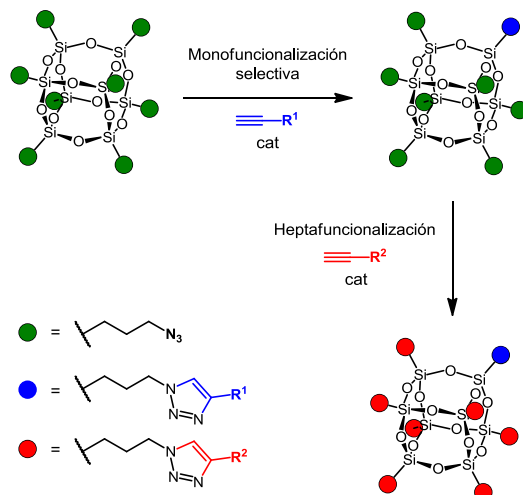
**Figura 3.1** Estructura de todos los posibles productos de sustitución parcial y sus isómeros estructurales (y estereoisómeros) que pueden generarse en la reacción de un POSS homo-octa-funcional con un agente de monofuncionalización en las estrategias de preparación de productos heterobifuncionales.

Nuestro grupo describió con anterioridad la síntesis del octakis(3-azidopropil)octasilsesquioxano (**6**, Esquema 3.1)<sup>[22]</sup> partiendo del octaaminoderivado **5** por medio de una reacción de transferencia de grupo diazo<sup>[23]</sup> y su octa-funcionalización altamente eficiente empleando la reacción de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizada por cobre(I)<sup>[24]</sup> (CuAAC, el ejemplo paradigmático de reacción "click")<sup>[1]</sup> con una variedad de alquinos terminales.<sup>[22, 25]</sup> Siguiendo este enfoque, se prepararon fácilmente varios derivados conjugados octaglicosil-POSS y se estudió a fondo su interacción multivalente con un receptor proteico complementario, la lectina modelo de origen vegetal concanavalina A (ConA), empleando para ello diversas técnicas biofísicas.<sup>[26]</sup>

Equipados con esta metodología sencilla y eficaz para la preparación de derivados POSS homo-octa-funcionalizados, nos planteamos demostrar que **6** es un producto de partida óptimo también para la síntesis controlada de derivados POSS hetero-bifuncionales estructuralmente bien definidos y equipados con grupos reactivos ortogonales entre sí que posibiliten su modificación posterior de forma independiente. Esta metodología nos permitirá obtener nanobloques de construcción muy versátiles para el ensamblaje controlado de diversos materiales funcionales híbridos. Para este fin, hemos seguido una estrategia simple en dos pasos (Esquema 3.2), que consiste en la mono-funcionalización altamente selectiva de **6** controlada por la reacción CuAAC con un alquino terminal, seguida de la posterior reacción CuAAC de los siete grupos azida restantes con un segundo tipo de alquino. Gracias a la alta compatibilidad química de la reacción CuAAC, esta estrategia basada en dos reacciones

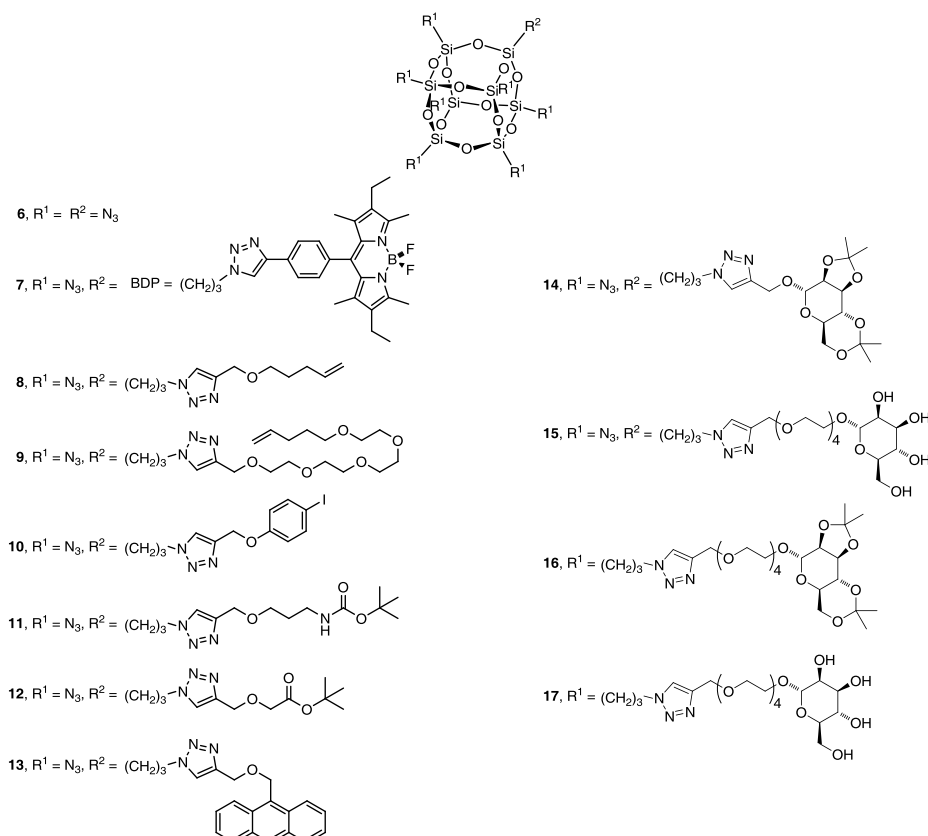


“click” secuenciales es un método poderoso para introducir una gran diversidad de pares de grupos funcionales químicamente ortogonales entre sí y mutuamente compatibles con el núcleo de POSS. Sin embargo, debido al carácter octafuncional y la simetría cúbica de **6**, el paso clave de mono-funcionalización requiere una optimización muy cuidadosa de las condiciones de reacción para evitar la formación de mezclas estadísticas complejas de derivados de tipo politriazolyl-POSS (Figura 3.1) que complicaría la purificación del producto monotriazolyl-POSS requerido.



**Esquema 3.2** Estrategia “click” secuencial para la preparación de POSS bifuncionales estructuralmente bien definidos.

En una publicación reciente (Capítulo 2), nuestro grupo ha descrito las propiedades fotofísicas y láser de un derivado fluorescente preparado a partir de **6** que contiene un solo sustituyente cromofórico de la familia de los 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY) (compuesto **7**, Esquema 3.3).<sup>[25]</sup> En este capítulo, se describe en detalle la metodología sintética desarrollada y los estudios de optimización realizados para la síntesis controlada del colorante híbrido **7** así como la extensión de la nueva metodología a la preparación de otros POSS hetero-bifuncionales (compuestos **8-17**, Esquema 3.3).



Esquema 3.3 Derivados híbridos POSS bifuncionales preparados a partir del compuesto 6

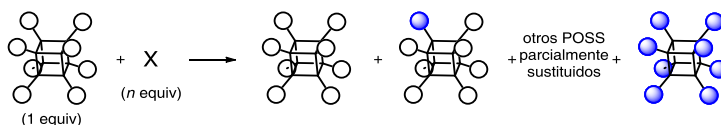
Como se discutirá a continuación, tanto la estequiometría de la reacción CuAAC de monofuncionalización inicial, como la naturaleza del catalizador de cobre(I) empleado necesitan ser ajustadas cuidadosamente para obtener resultados óptimos. Como prueba de la versatilidad de esta estrategia sintética, hemos preparado un conjunto de POSS hetero-bifuncionales estructuralmente bien definidos con una variedad de grupos funcionales con reactividad ortogonal. Asimismo, como se verá en el capítulo siguiente, se han preparado también derivados de POSS que combinan en el clúster un colorante fluorescente y varios epítopos sacarídicos que han demostrado ser de gran utilidad como sondas para bioimagen de receptores específicos situados en la superficie exterior de la célula.

### 3.2 Resultados y discusión

La octaazida **6** es un armazón de partida ideal para la preparación de derivados bifuncionales de POSS debido al carácter irreversible, amplia variabilidad de sustratos que

pueden ser empleados y excelente eficiencia de la reacción CuAAC, que puede permitir un control preciso de la extensión de la derivatización con una gran variedad de alquinos terminales. Sin embargo, con ocho grupos reactivos y simétricamente equivalentes sobre el cubo de **6**, la formación de mezclas estadísticas de productos polifuncionalizados (y sus isómeros; ver Figura 3.1) es inevitable bajo las condiciones de reacción homogéneas habituales. Como en otros casos de mono-derivatización de un sustrato homo-polifuncional, la formación de productos polisustituídos se puede minimizar mediante una selección juiciosa de la estequiometría de los reactivos, dependiendo del número de grupos reactivos equivalentes del sustrato.<sup>[27]</sup> Sorprendentemente, no hay consenso en la literatura sobre la estequiometría que debería emplearse preferiblemente para la monoderivatización selectiva de un POSS homo-octafuncional, apareciendo recogidas en la bibliografía relaciones molares de reactivo/POSS que varían ampliamente entre 1:1 y 1:8. Si se asume que todos los grupos funcionales en el derivado de POSS octafuncional así como en sus derivados parcialmente sustituidos presentan todos la misma reactividad independientemente del grado de sustitución,<sup>[28]</sup> se formará una mezcla estadística de productos que siguen idealmente una distribución binomial.<sup>[27]</sup> La Tabla 3.1 muestra la distribución binomial teórica de todos los productos posibles que se obtendrían en la reacción de derivatización de un POSS octafuncional (o cualquier otra molécula con ocho grupos reactivos equivalentes) empleando un reactivo monofuncional, que van desde el sustrato de partida sin reaccionar (no sustituido) hasta el producto completamente (octa-)sustituido, en función de la estequiometría empleada en la reacción. Para una mezcla de reacción equimolar de POSS y del reactivo de derivatización ( $n = 1$ , Tabla 3.1, entrada 4), el rendimiento máximo de POSS monosustituido teóricamente esperado es de sólo un 39.27%, junto a un 34.36% de POSS sin reaccionar, y con el sustrato restante (26.37%), transformado en una mezcla de productos polisustituídos (principalmente derivados di- y tri-sustituídos).<sup>[29]</sup> En estas condiciones, hasta el 60.73% del reactivo de derivatización se desperdicia en la producción de productos no deseados, lo que sería insostenible para la derivatización con sustituyentes costosos y altamente elaborados y/o para sustratos POSS valiosos. Recalculando de nuevo los rendimientos con respecto a la cantidad total de POSS que ha reaccionado (es decir, restando el material de partida recuperado, ver Tabla 3.1), la mezcla de productos sustituidos que se obtiene en este caso consta principalmente de un 59.83% de POSS monosustituido, un 29.91% de disustituido, y un 8.55% de trisustituido, junto con cantidades insignificantes (<2%) de derivados sustituidos superiores.

**Tabla 3.1** Rendimientos teóricos<sup>[a]</sup> de los productos formados en la reacción entre un POSS homo-octafuncional y un reactivo de monofuncionalización (X) en función de la estequiometría de la reacción ( $n$ ), según lo predicho por la ley de distribución binomial<sup>[b]</sup>



Número de vértices del POSS que han reaccionado									
$n$	0 <sup>[c]</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8
0.1	90.43	95.65	4.24	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	77.57	89.25	10.08	0.65	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	59.67	78.92	18.41	2.46	0.20	0.01	0.00	0.00	0.00
1.0	34.36	59.83	29.91	8.55	1.53	0.17	0.01	0.00	0.00
2.0	10.01	29.67	34.61	23.07	9.61	2.56	0.43	0.04	0.00
3.0	2.33	11.44	24.03	28.83	21.63	10.38	3.11	0.53	0.04
4.0	0.39	3.14	10.98	21.96	27.45	21.96	10.98	3.14	0.39
5.0	0.04	0.52	3.04	10.14	21.13	28.17	23.48	11.18	2.33
6.0	0.00	0.04	0.38	2.31	8.65	20.76	31.15	26.70	10.01
7.0	0.00	0.00	0.01	0.11	1.00	5.61	19.63	39.27	34.36
8.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.0

<sup>[a]</sup> Calculado con respecto al reactivo limitante. <sup>[b]</sup> Para los cálculos estadísticos, se asumió que todos los grupos reactivos de los POSS presentan la misma reactividad, independientemente del grado de sustitución. <sup>[c]</sup> Rendimiento de POSS sin reaccionar relativo al total de POSS de partida.

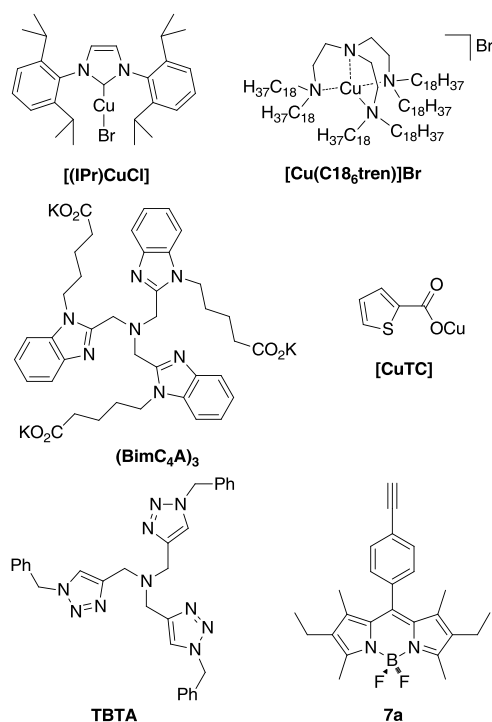
A medida que disminuye la relación estequiométrica  $n$  de reactivo/POSS (Tabla 3.1, entradas 1-3), mejora la selectividad de la monosustitución a expensas de reducir la conversión global del POSS. Esto sería una estrategia simple y muy eficaz para la preparación selectiva de compuestos POSS monosustituidos dado que el exceso de POSS sin reaccionar se puede recuperar fácilmente a partir de la mezcla de reacción y reutilizarlo después en reacciones posteriores.<sup>[30]</sup> La utilización de una relación molar 1:10 de reactivo/POSS ( $n = 0.1$ , Tabla 3.1, entrada 1) daría lugar al compuesto monosustituido con una selectividad muy alta (95.65%) y tan sólo el 8.4% del reactivo de derivatización se perdería en la producción de derivados de POSS con un grado de sustitución superior, aunque si se calcula el rendimiento total de producto de monosustitución con respecto al POSS de partida obtendríamos sólo un 9.16%. Una relación 1:4 de reactivo/POSS ( $n = 0.25$ , Tabla 3.1, entrada 2) daría un 90% de selectividad para la monosustitución con un rendimiento total del 20% si se calcula con respecto al POSS de partida, y con una pérdida del 20% de reactivo de derivatización invertido en la producción de derivados polisustituidos. Con esta estequiometría, podría alcanzarse un

compromiso equilibrado para el caso de reactivos baratos. Se puede concluir también a partir del análisis de la Tabla 3.1 que ningún otro derivado de POSS parcialmente sustituido sería accesible de forma selectiva mediante una simple modificación de la estequiometría de reacción ya que se forman siempre mezclas estadísticas complejas de productos para  $1 \leq n < 8$  (Tabla 3.1, entradas 5-10). Por supuesto, este corolario no es necesariamente cierto para el caso de reactivos estéricamente impedidos o polifuncionales.

Aunque en principio la monofuncionalización de **6** vía CuAAC podría conseguirse simplemente llevando a cabo la reacción con un gran exceso inicial de POSS con respecto al alquino como se explicó anteriormente, se ha descrito que el uso de la reacción CuAAC para la monofuncionalización de algunas poliazidas puede dar lugar a distribuciones de productos inusuales que se desvían significativamente de las esperadas sobre una base puramente estadística. Así, algunas 1,2- y 1,3-diazidas conformacionalmente restringidas rinden preferentemente bistriazoles a expensas del monotriazol esperado, incluso cuando se emplea un exceso de diazida con respecto al alquino.<sup>[31]</sup>

Este resultado inusual se ha atribuido tentativamente a la participación directa del intermedio triazolil-Cu promoviendo la reacción click subsiguiente sobre el grupo azida vecinal.<sup>[31]</sup>

Mientras que el **TBTA** (Esquema 3.4), un ligando acelerador de cobre(I) ampliamente utilizado en reacciones CuAAC, no tenía un efecto significativo sobre la selectividad de las reacciones con diazidas, Finn y colaboradores describieron que ligandos de tipo (bencimidazolilmetil)amina (por ejemplo, **(BimC<sub>4</sub>A)<sub>3</sub>**, Esquema 3.4) dieron el derivado de monotriazol como producto principal en la relación estadística esperada 2:1 mono-/bis-triazol en el caso de una 1,3-diazida conformacionalmente



**Esquema 3.4** Catalizadores de Cu, ligandos y alquino modelo empleado en los estudios de optimización para la monofuncionalización vía CuAAC de la octaazida **6**

rígida y utilizando una estequiometría 1:1 diazida/alquino.<sup>[31b]</sup>

Para el estudio inicial de optimización de la monofuncionalización vía CuAAC de la octaazida **6**, se seleccionó el colorante fluorescente de tipo BODIPY **7a** (Esquema 3.4) como alquino modelo, que ya habíamos utilizado anteriormente para la preparación de un clúster de octa-BODIPY-POSS (Capítulo 2).<sup>[25]</sup> Se escogió este alquino porque la reacción podía seguirse muy fácilmente a simple vista por TLC y proporciona un derivado de POSS **7** (Esquema 3.3) marcado con una única sonda fluorescente y siete grupos azida reactivos adicionales listos para su posterior funcionalización con cualquier molécula de interés que presente un grupo alquino terminal. Además, como ya hemos descrito en el capítulo 2, el compuesto **7** es un colorante híbrido muy interesante para la preparación de materiales láser de estado sólido con una estabilidad térmica y fotoquímica mejorada.<sup>[25]</sup>

Sobre la base de los cálculos estadísticos anteriores, se seleccionó una estequiometría muy conservadora, empleando **6** en un exceso molar 10 veces superior con respecto al alquino **7a** para garantizar una selectividad muy elevada del producto monofuncionalizado **7** (véase la Tabla 3.1, entrada 1). Sin embargo, en las condiciones previamente optimizadas por nuestro grupo para la síntesis de POSS octafuncionalizados,<sup>[22]</sup> el uso de CuSO<sub>4</sub>/ascorbato sódico como catalizador en una mezcla bifásica de disolventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1)<sup>[32]</sup> dio un rendimiento muy bajo (9%) de monotriazolil-POSS **7** junto con el producto **6** en exceso y una mezcla compleja de productos politriazolil-POSS (Tabla 3.2, entrada 1) que no fue caracterizada. Así, en ausencia de ligandos de cobre, la octaazida **6** mostró la misma preferencia por la formación de productos polisustituídos observada previamente por Finn<sup>[31]</sup> para poliazidas conformacionalmente restringidas. Usando la misma relación molar **6/7a** 10:1 que en el ensayo anterior, se examinaron diferentes catalizadores de cobre (Esquema 3.4) y condiciones de reacción (disolventes acuosos o anhidros; con o sin base añadida; a temperatura ambiente o con irradiación por microondas) con el objetivo de minimizar la formación de productos de tipo politriazolil-POSS para obtener **7** en el rendimiento estadístico esperado.

El catalizador tiofen-2-carboxilato de cobre(I) ([CuTC], Esquema 3.4), utilizado recientemente en reacciones CuAAC con azidas de sulfonilo,<sup>[33]</sup> dio un rendimiento ligeramente superior para el producto **7** (25%) tras calentar durante dos horas bajo irradiación con microondas en THF (Tabla 3.2, entrada 2), pero este resultado está todavía lejos del valor estadístico esperado. Se obtuvieron mejores resultados con el catalizador de cobre(I) que lleva como ligando un carbeno N-heterocíclico<sup>[34]</sup> ([CuCl(IPr)], Esquema 3.4) o con el ligando tetradentado descrito por Finn (BimC<sub>4</sub>A)<sub>3</sub><sup>[35]</sup> (Esquema 3.4) (Tabla 3.2, entradas 3 y 4, respectivamente). El catalizador recientemente descrito [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br<sup>[36]</sup> (Esquema 3.4)

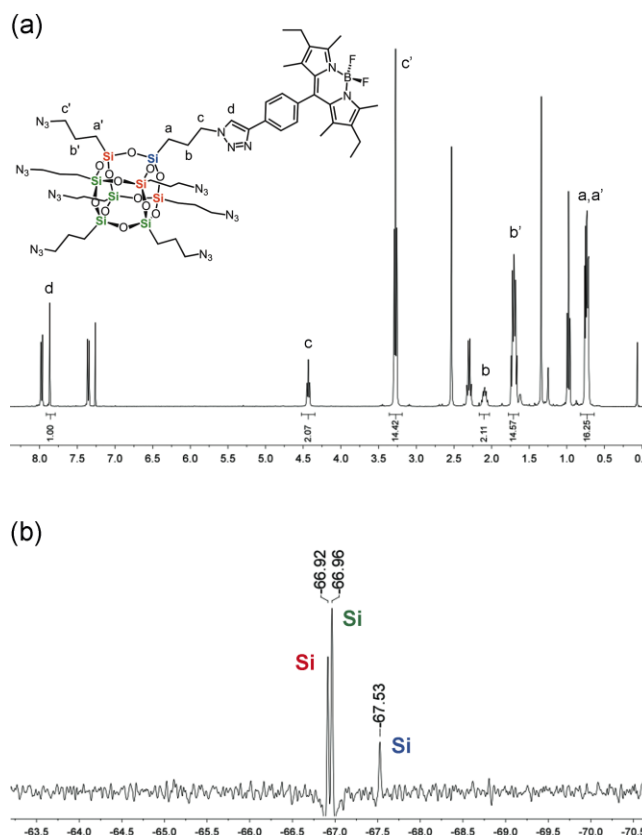
empleando base de Hünig en tolueno como disolvente y con irradiación de microondas dio el mejor rendimiento de **7** (82%) (Tabla 3.2, entrada 5), próximo al valor esperado estadísticamente (95,65%). En todos los casos, el resto del alquino **7a** no consumido en la monosustitución se transformó a una mezcla compleja de politriazolil-POSS, como muestra el análisis de  $^1\text{H}$  RMN de las restantes fracciones de cromatografía en columna. La estructura de **7** se confirmó de forma inequívoca mediante espectrometría de masas de alta resolución y espectroscopia multinuclear de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ) (véase la Figura 3.2 y la parte experimental).

**Tabla 3.2** Optimización de la reacción CuAAC para la monofuncionalización de la octaazida-POSS **6** con el alquino fluorescente **7a** para dar el correspondiente POSS bifuncional **7**.<sup>[a]</sup>

	Catalizador	Base	Disolvente (v/v)	T [°C] <sup>[b]</sup>	t [h]	Rdto [%] <sup>[c]</sup>
1	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, ascorbato sódico	-	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O 1:1	25	20	9
2	[CuTC]	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> NEt	THF	80 (MW)	2	25
3	[CuCl(IPr)]	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> NEt	PhMe	80 (MW)	11	57
4	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O, ascorbato sódico, (BimC <sub>4</sub> A) <sub>3</sub>	-	THF/H <sub>2</sub> O 5:1	25	15	48
5	[Cu(C18 <sub>6</sub> tren)]Br	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> NEt	PhMe	80 (MW)	6	82

[a] Se empleó una relación molar **6/7a** = 10:1 en todos los casos. [b] MW indica que la reacción se llevó a cabo bajo irradiación con microondas. [c] Rendimientos aislados (cromatografía en columna).

El grado de sustitución se puede determinar fácilmente a partir del patrón de distribución de las integrales 7(4+3):1 (Figura 3.2a) en  $^1\text{H}$  RMN y 4:3:1 en  $^{29}\text{Si}$  RMN (Figura 3.2b), como es de esperar considerando la simetría molecular de un POSS cúbico monosustituido.<sup>[15a]</sup> Los desplazamientos químicos de  $^{29}\text{Si}$  se encuentran dentro de la región esperada para un POSS cúbico sustituido con grupos alquílicos (-65 a -70 ppm).<sup>[2a]</sup>

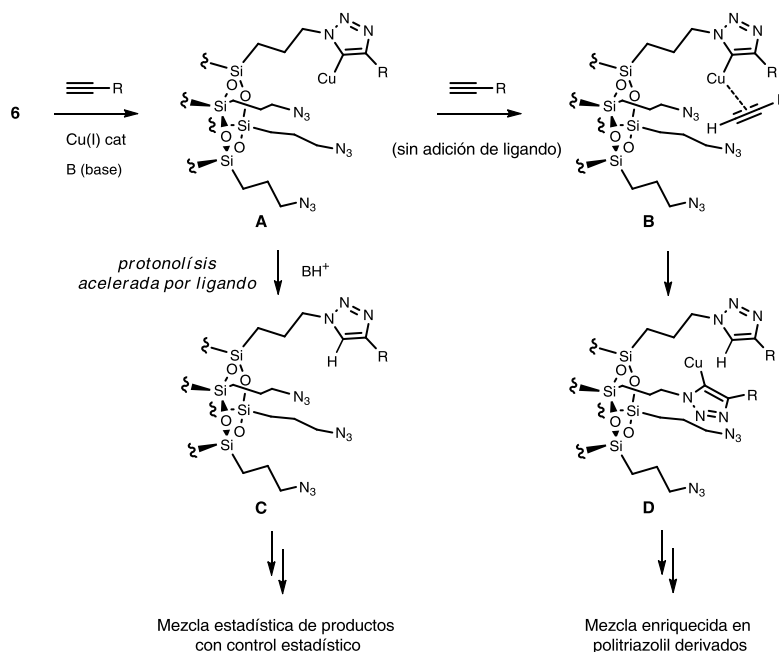


**Figura 3.2** a) Espectros de  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y b)  $^{29}\text{Si}$  RMN (79,5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **7** con asignaciones parciales de los picos significativos. Los números debajo de la línea espectral en (a) muestran las integrales relativas de las regiones correspondientes.

Una posible hipótesis para explicar el efecto del ligando observado sobre la selectividad de la reacción CuAAC de monofuncionalización es la que se explica a continuación. De acuerdo con estudios mecanísticos anteriores descritos por Finn y colaboradores,<sup>[31]</sup> la incorporación de ligandos quelantes en el catalizador de cobre provoca que el paso limitante de la velocidad de la reacción CuAAC cambie de ser la protonólisis del intermedio triazolil-Cu a ser la secuencia de desprotonación del alquino seguida de cicloadición. Por lo tanto, en las condiciones de Sharpless (sin ligando), se espera que ocurra una acumulación del intermedio triazolil-Cu **A** (Esquema 3.5) que favorezca cinéticamente su coordinación al alquino (**B**) y la reacción intramolecular subsiguiente para dar lugar a productos politriazolil-POSS (**D**). Por el contrario, la presencia de ligandos quelantes de Cu dificulta la coordinación adicional del metal en **A** a la vez que acelera la reacción de protonólisis del intermedio **A** para dar **C**, desviando así el catalizador de cobre hacia otro ciclo



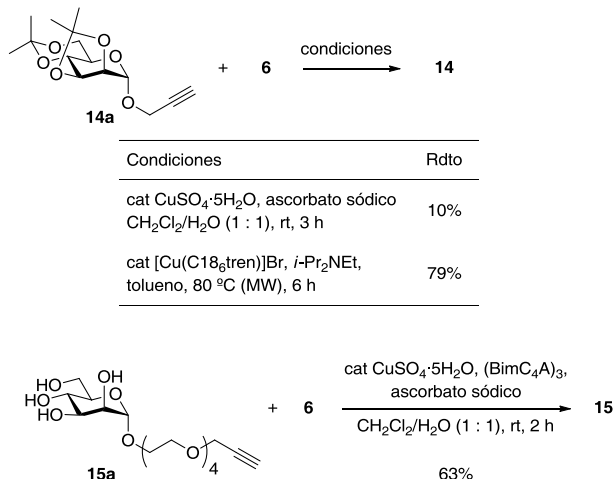
de desprotonación-cicloadición intermolecular para dar finalmente una mezcla de triazoles controlada estadísticamente cuya composición final queda determinada esencialmente por la estequiometría inicial de los reactivos y la ley de distribución binomial (Tabla 3.1). La correspondencia aparente observada entre la selectividad de la reacción de monofuncionalización y el carácter dador de los ligandos de cobre (que se correlaciona aproximadamente con su afinidad protónica) está de acuerdo con esta hipótesis mecánica.<sup>[37]</sup>



**Esquema 3.5** Hipótesis mecánica simplificada para explicar el efecto observado del ligando sobre la selectividad de la monofuncionalización de la octaazida **6** vía CuAAC.

Se observó un efecto catalítico similar sobre la selectividad para la reacción CuAAC de **6** con otros alquinos (Esquema 3.6). Así, el alquino derivado de manosa protegida con grupos isopropiliden acetal **14a** dio un rendimiento muy bajo (10%) del correspondiente POSS monosustituido **14** cuando se emplearon las condiciones de Sharpless en un disolvente acuoso bifásico y el mismo exceso molar (10:1) de POSS. El rendimiento mejoró hasta el 79% cuando se usó el catalizador  $[\text{Cu}(\text{C18}_{\text{tren}})]\text{Br}$  en las condiciones de reacción optimizadas con la misma estequiometría. Sin embargo, estas condiciones optimizadas no son apropiadas para el caso de alquinos solubles en agua tales como **15a**, que no son fácilmente solubles en disolventes orgánicos apolares, necesarios para solubilizar el catalizador. En este caso, la

adición de un ligando soluble en agua tal como (BimC<sub>4</sub>A)<sub>3</sub> (en una relación molar 2:1 ligando/cobre) a una mezcla bifásica de disolventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O que contenga una cantidad catalítica de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O y un exceso de ascorbato sódico resultaron ser las mejores condiciones para la preparación del derivado monosustituido POSS **15** en un tiempo de reacción corto y con un rendimiento razonablemente bueno (63%).

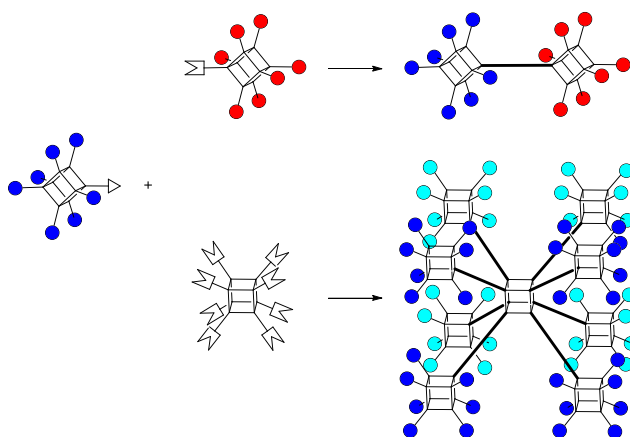


**Esquema 3.6** Síntesis de los mono-glicosil-POSS **14** y **15**. Se empleó una relación molar 2:1 (BimC<sub>4</sub>A)<sub>3</sub>/cobre.

Para estudiar el alcance y la versatilidad de este método, se sintetizó un conjunto de POSS hetero-bifuncionales **8-13** con grupos reactivos ortogonales empleando una variedad de alquinos terminales funcionalizados con alquenos (**8a** y **9a**), halobenceno (**10a**), amina protegida (**11a**), ácido carboxílico protegido (**12a**), o antraceno (**13a**) (Tabla 3.3). Los productos monotriazolil-POSS se obtuvieron con buenos rendimientos y con una selectividad excelente empleando las condiciones previamente optimizadas. Las estructuras de los nuevos POSS se confirmaron de forma inequívoca por espectrometría de masas de alta resolución y espectroscopía de RMN multinuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>29</sup>Si) (véase la parte experimental). La recuperación del exceso del compuesto **6** a partir del crudo de la reacción fue casi cuantitativa en todos los casos (ver Tabla 3.3).

Este conjunto de nuevos POSS hetero-bifuncionales permiten la modificación posterior de la funcionalidad de la estructura de silsesquioxano de forma selectiva y gradual, ya sea en los grupos azida o en la otra funcionalidad ortogonal, para la preparación de nuevos materiales híbridos bifuncionales con estructuras bien definidas. Por ejemplo, la combinación (en el orden apropiado) de la heptafunctionalización CuAAC posterior con una reacción de

homometátesis o de metátesis cruzada (**8**, **9**), o un acoplamiento cruzado catalizado por metales de transición (**8**, **9**, **10**), o la desprotección seguida de formación de ésteres (**12**) o amidas (**11**, **12**), o la desprotección de amina seguida de una reacción de transferencia de grupo diazo y posterior CuAAC (**11**), o una cicloadición de Diels-Alder (**13**) podrían brindar acceso a una gran variedad de POSS hetero-bifuncionales. Además, los POSS bifuncionales obtenidos con esta metodología son excelentes nanobloques de construcción (“nanobuilding-blocks”) ya que pueden ser fácilmente homo- o hetero-dimerizados para proporcionar diadas de POSS simétricas o asimétricas, respectivamente,<sup>[12c, 19]</sup> o bien pueden ensamblarse con otros POSS homo-octafuncionalizados de reactividad complementaria para dar estructuras 3D aún más complejas (Esquema 3.7).



**Esquema 3.7** Posibles aplicaciones de los POSS mono-/hepta-funcionalizados de reactividad complementaria para la nanoconstrucción de diadas y estructuras híbridas 3D.

### 3.3 Conclusiones

El estudio que hemos llevado a cabo demuestra que el octakis(3-azidopropil)octasilsesquioxano **6**, de fácil obtención, es un material de partida ideal para el ensamblaje controlado de POSS hetero-bifuncionales bien definidos a escala molecular. La introducción sucesiva de dos grupos diferentes con reactividad ortogonal en el núcleo de POSS se ha logrado de manera eficiente a través de dos funcionalizaciones secuenciales mediante reacción “click” CuAAC acelerada por ligando. La mono-funcionalización inicial de **6** es la etapa clave y requiere una optimización cuidadosa de las condiciones de reacción para minimizar la formación de mezclas complejas de productos POSS polisustituídos. La selectividad de esta reacción no sólo depende de la estequiometría de los reactivos, sino

también de la capacidad donadora de los ligandos en el catalizador de cobre. Un simple cálculo estadístico resultó ser esencial para poder tomar una decisión informada sobre la estequiometría de la reacción adecuada y necesaria para la mono-funcionalización selectiva de las moléculas de POSS homo-octafuncionales. La evaluación de distintos catalizadores de cobre confirmó que el catalizador que proporciona los resultados más selectivos y cercanos a los esperados estadísticamente es el  $[\text{Cu}(\text{C18}_6\text{tren})\text{Br}]$ . Este efecto del ligando de cobre sobre la selectividad del catalizador se atribuyó a la aceleración de la reacción de protonólisis del intermedio triazolil-Cu de la reacción CuAAC en combinación con la obstaculización estérica de la coordinación posterior del metal a una segunda unidad de alquino en este intermedio. La presencia de un ácido carboxílico anclado en el ligando, propuesta por Finn,<sup>[31b]</sup> no parece ser realmente necesaria para la aceleración de esta hidrólisis.

La amplia variabilidad de sustratos y alta eficiencia de la funcionalización mediante reacción “click” facilita la preparación de una gran variedad de nuevos derivados POSS hetero-bifuncionales con una distribución perfectamente controlada de grupos funcionales en una geometría cúbica. Para demostrar la versatilidad de esta metodología, hemos preparado un conjunto de POSS bifuncionales con reactividad ortogonal, que se pueden utilizar como nanobloques de construcción para el ensamblaje controlado de nanomateriales híbridos. Esta metodología se ha aplicado también a la síntesis de un POSS monofuncionalizado con una sonda fluorescente y con 7 posiciones reactivas adicionales que permiten la introducción de sendos epítomos bioreconocibles obteniendo así sistemas multivalentes de interés para estudios de interacción en biología celular, fotónica y bioimagen (ver Capítulos 2 y 4)

### 3.4 Parte Experimental

#### 3.4.1 Consideraciones Generales

##### Disolventes y Reactivos

Las reacciones con reactivos sensibles se realizaron bajo atmósfera de argón, excepto las indicadas en cada caso. Los disolventes anhidros se trataron mediante las técnicas habituales de secado<sup>[38]</sup> o con un sistema de purificación de disolventes PureSolv modelo PS-400-3-MD para el secado de los siguientes disolventes: THF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeCN, tolueno, éter dietílico y DMF. El dioxano se destiló sobre Na/benzofenona bajo atmósfera de argón inmediatamente antes de su utilización.

La activación de los tamices moleculares pulverizados (4 Å) se realizó mediante el calentamiento a temperaturas elevadas en un microondas doméstico (700 W, 3×1 min) en un matraz que se dejó enfriar después a vacío, despresurizando finalmente con argón.

Los catalizadores de cobre(I): [CuCl(IPr)],<sup>[34]</sup> (BimC<sub>4</sub>A)<sub>3</sub>,<sup>[31b, 35]</sup> y [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br<sup>[36]</sup> se prepararon siguiendo los procedimientos descritos. La manipulación de los catalizadores de cobre(I) sensibles a la oxidación se realizó en una cámara de guantes en atmósfera de argón.

Los reactivos y disolventes utilizados provienen de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Scharlab y Acros, y se usaron sin purificar.

### Procedimientos cromatográficos

El seguimiento de las reacciones se ha llevado a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF) empleando cromatofolios de gel de sílice tipo 60 F<sub>254</sub> (230-400 mesh) con soporte de aluminio y un espesor de capa de 0.2 mm (*Merck*). El análisis de las placas se realizó bajo una lámpara de UV 254/365 nm y por revelado por inmersión en la correspondiente disolución de revelador y posterior secado y calentamiento a temperaturas superiores a 100 °C. Los reveladores empleados fueron: disolución de molibdato amónico y sulfato de cerio(IV) en H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% (revelador de Hanessian), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% en EtOH (oleum), disolución de ácido fosfomolibdico al 10% en EtOH, o con disolución acuosa de KMnO<sub>4</sub> al 0.5% con un 5% de KCO<sub>3</sub> para la detección de alquinos. La detección de azidas se realizó por inmersión de las placas en una disolución de Ph<sub>3</sub>P en AcOEt al 1% (w/v) y, tras secar a 50 °C, en una disolución de ninhidrina al 5% en EtOH, calentando finalmente a 100 °C.

La purificación y separación de la mayor parte de los productos de reacción se ha realizado mediante cromatografía “flash” en columna, utilizando como fase estacionaria gel de sílice de tipo 60, con un tamaño de tamizado 230-400 ASTM (*Merck*) o con óxido de aluminio neutro 90 (grado de activación I) con un tamaño de tamizado 70-230 ASTM (*Merck*). También se realizaron purificaciones empleando Sephadex® LH-20 con un tamaño de lecho de 25-100 µm (*Sigma-Aldrich*). El eluyente empleado se indica en cada caso, las proporciones de disolvente están expresadas en volumen/volumen.

Para las filtraciones se empleó *Celita*® -545 de la casa comercial *SDS*.

### Microondas

Las reacciones con irradiación de microondas se realizaron en un reactor monomodo Discover System de CEM Corporation, usando tubos estándar de Pyrex (10 o 35 mL de capacidad) cerrados con tapón de teflón.

### Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (completamente desacoplados) se realizaron a temperatura ambiente (20-25 °C). Los disolventes deuterados se usaron sin purificación adicional. El disolvente deuterado se especifica en cada caso ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ). Los experimentos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se llevaron a cabo empleando los siguientes espectrómetros: *Varian INOVA-300* (300 y 75 MHz, respectivamente), *Bruker Avance-300* (300 y 75 MHz, respectivamente), *Varian INOVA-400* (400, 100 MHz, respectivamente, y  $^{29}\text{Si}$  a 79.5 MHz), *Varian MERCURI-400* (400, 100 MHz, respectivamente, y  $^{19}\text{F}$  a 376 MHz), *Varian INOVA-500* (500 y 125 MHz, respectivamente). Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón ( $\delta$ , ppm), y están referenciados utilizando la señal residual de protón del disolvente deuterado utilizado en cada caso:  $\text{CDCl}_3$ , 7.26 ppm ( $^1\text{H}$  RMN) y 77.00 ppm ( $^{13}\text{C}$  RMN);  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 3.31 ppm ( $^1\text{H}$  RMN) y 49.05 ppm ( $^{13}\text{C}$  RMN);  $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$  2.05 ppm ( $^1\text{H}$  RMN) y 30.83 ppm ( $^{13}\text{C}$  RMN). Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  se describen indicando en cada caso el desplazamiento químico, la multiplicidad aparente de cada señal, el valor de las constantes de acoplamiento  $J$  (Hz), el número relativo de protones (deducidos por integración) y la asignación estructural cuando fue posible. El aspecto y la multiplicidad de las señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: s (singlete), sa (singlete ancho), d (doblete), dd (doble doblete), td (tripleto de doblete), t (tripleto), q (cuadruplete) y m (multiplete). Los protones diastereotópicos de los centros proquirales se nombrarán como H y H'. La asignación de las señales de  $^1\text{H}$  se ha deducido en base a los experimentos de homocorrelación  $^1\text{H}/^1\text{H}$  COSY (*Correlated Spectroscopy*). La asignación de las señales de  $^{13}\text{C}$  se ha deducido de experimentos de correlación heteronuclear  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) y HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*). Los espectros monodimensionales de  $^{29}\text{Si}$  se registraron empleando tubos de teflón de 5 mm de Wildmad's (PTFE-FEP) (copolímero politetrafluoroetileno/etileno-polipropileno fluorado) para evitar las interferencias de los borosilicatos de los tubos de vidrio estándar.

### Rotación óptica específica ( $[\alpha]_D$ )

Las rotaciones ópticas observadas  $[\alpha]_D$  se midieron a temperatura ambiente en un polarímetro *Perkin-Elmer 241-MC* con una lámpara de Na ( $\lambda = 589$  nm, línea D), utilizando una célula de cuarzo de 1 dm de longitud y 1 mL de capacidad. En cada caso se indica el

disolvente y la concentración ( $c$  en g/100 mL) utilizados. El valor de la rotación óptica específica se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$[\alpha]_D = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c}$$

$\alpha$  = rotación óptica observada

$l$  = 1 dm

$c$  = g/100 mL

### **Espectrometría de Masas**

Los espectros de masas de baja resolución (**MS**) se registraron en un espectrómetro *Hewlett Packard LCMS 1100 MSD* (analizador cuadrupolar acoplado a un HPLC) por inyección directa de la muestra por medio de la técnica de *electrospray* en su modo positivo (**ESI+**), aplicando un voltaje capilar de 4000 V, una temperatura de secado de 330 °C y usando como portador una mezcla H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) con 1% AcOH. La espectrometría de masas de alta resolución (**HRMS**) se realizó en un equipo Agilent 6520 Accurate Mass QTOF LC/MS mediante la técnica de electrospray en su modo positivo (**ESI+**). Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa/carga ( $m/z$ ). La determinación de la masa exacta ( $[M]^+$ ) y la fórmula molecular del compuesto se han obtenido tras la aplicación de un algoritmo de deconvolución del espectro obtenido ("*Find by Molecular Feature*", de Agilent Technologies).

### **MALDI-TOF**

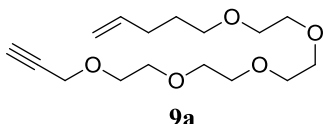
Los análisis MALDI-TOF se llevaron a cabo usando un espectrómetro de masas Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipado con un láser pulsado de nitrógeno ( $\lambda = 337$  nm, 3 ns anchura de pulso, y 3 Hz de frecuencia). Los iones positivos generados por la desorción láser se introdujeron en el tubo de tiempo de vuelo con un voltaje de aceleración de 25 kV, trabajando en modo lineal y con extracción retardada de los iones. Los espectros de masas se obtuvieron en un intervalo de  $m/z$  de 2000-15000 u. Como calibración externa se usaron los valores  $[M+H]^+$  de angiotensina I, hormona adrenocorticotropa (ACTH, fragmentos 1-17, 18-39 y 7-38), insulina bovina, tiorredoxina (*E. Coli*) y apomioglobina (de caballo) de las mezclas de calibrado 2 y 3 péptido Sequazyme Mass Standards Kit de Applied Biosystems. Como matriz, se empleó el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (>98%, Fluka) en una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo o agua. Las muestras se disolvieron en uno u otro disolvente dependiendo de su solubilidad a una concentración de 1

mg/mL. Las disoluciones se mezclaron con diferentes proporciones de matriz y 1  $\mu$ L de esta disolución se depositó sobre una placa de muestras de acero inoxidable y se secó al aire.

### 3.4.2 Síntesis de alquinos

Los alquinos terminales empleados en la síntesis de los derivados POSS hetero-bifuncionales se prepararon siguiendo metodologías descritas: **7a**,<sup>[39]</sup> **8a**,<sup>[40]</sup> **10a**,<sup>[41]</sup> **11a**,<sup>[42]</sup> **12a**,<sup>[43]</sup> **13a**,<sup>[44]</sup> **14a**,<sup>[45]</sup> **15a** y **16a**.<sup>[26]</sup>

### 4,7,10,13,16-Pentaoxahenicos-20-en-1-ino (**9a**)



Una suspensión de NaH al 60% en parafina (103 mg, 2.58 mmol) y 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-ol (200 mg, 0.861 mmol) en THF anhidro (5 mL) se agitó 20 minutos en atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo, se añadió gota a gota 5-bromopent-1-eno (0.215 mL, 1.722 mmol). Tras agitar a t.a. durante 24 horas, la suspensión se diluyó con agua (50 mL) y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 $\times$ 50 mL), las fases orgánicas se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y posteriormente se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (hexano/AcOEt 2:1) para dar **9a** (124.5 mg, 48%) como un aceite amarillento.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.66 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.00-2.17 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.42 (t, 1H,  $J=2.4$  Hz,  $\text{HCCCH}_2\text{O}$ ), 3.45 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.54-3.73 (m, 16H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.19 (d, 2H,  $J = 2.4$  Hz,  $\text{HCCCH}_2\text{O}$ ), 4.90-5.05 (m, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.79 (ddt, 1H,  $J = 17.1, 10.2, 6.6$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  28.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 30.4 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 58.5 ( $\text{HCCCH}_2\text{O}$ ), 70.2-70.8 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 74.6 ( $\text{HCCCH}_2\text{O}$ ), 79.8 ( $\text{HCCCH}_2\text{O}$ ), 115.1 ( $\text{CHCH}_2$ ), 138.7 ( $\text{CH}_2\text{CHCH}_2$ ).

MS (API-ESI):  $m/z$  301.2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 323.3 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ].

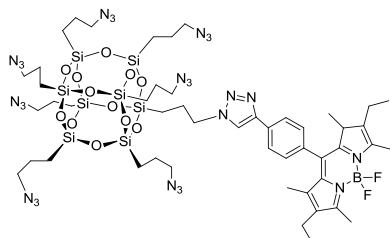
### 3.4.3 Síntesis de derivados de POSS heterobifuncionales 7-15

Todas las reacciones se llevaron a cabo empleando una disolución del azido-POSS **6**<sup>[22]</sup> y el alquino terminal correspondiente (10 equiv.), sobre la que se añadió la disolución del



catalizador de cobre(I). En todos los casos, Si\* hace referencia al átomo de silicio con el sustituyente (1,2,3-triazol-1-yl)propilo, resultante de la reacción click.

### Compuesto 7<sup>[25]</sup>



**Método A** (con CuSO<sub>4</sub>/ascorbato sódico): A una disolución de 4,4-difluoro-8-(4'-etnilfenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (**7a**) (2.8 mg, 0.006 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) bajo atmósfera de argón, se añadió azido-POSS **6** (73.6 mg, 0.060 mmol) seguido de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.54 mg, 0.003 mmol) y ascorbato sódico (3.4 mg, 0.020 mmol) en agua (3 mL). Tras agitar durante 20 h a t.a., la mezcla de reacción se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo así obtenido se purificó mediante cromatografía flash en columna (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) empleando primero hexano/AcOEt (15:1) para recuperar el producto de partida **6** sin reaccionar, seguido de hexano/AcOEt (5:1) para obtener **7** como un aceite rojo viscoso (1 mg, 9%). Se obtuvo también una mezcla de productos de polisustitución que no fueron aislados.

**Método B** (con tiofeno-2-carboxilato de cobre(I)): A una disolución de azido-POSS **6** (80 mg, 0.073 mmol) y 4,4-difluoro-8-(4'-etnilfenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (**7a**) (3 mg, 7.420 μmol) en THF anhidro (1 mL) bajo atmósfera de argón, se añadió tiofeno-2-carboxilato de cobre(I) (0.3 mg, 1.573 μmol) y *i*Pr<sub>2</sub>NEt (4 μL, 0.023 mmol). La mezcla de reacción se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 2 h, el crudo se filtró sobre SiO<sub>2</sub>, eluyendo con AcOEt y el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo así obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (SiO<sub>2</sub>) empleando primero hexano/AcOEt (15:1) para recuperar el producto de partida sin reaccionar **6** (67 mg, 93% calculado con respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/AcOEt (5:1) para obtener **7** como un aceite rojo viscoso (2.8 mg, 25%).

**Método C** (con  $(\text{BimC}_4\text{A})_3$ ) a) Formación del complejo de cobre(I): Sobre una disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (4.12 mg, 4.590  $\mu\text{mol}$ ) y  $(\text{BimC}_4\text{A})_3$  (7.2 mg, 9.180  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{H}_2\text{O}$  desoxigenada (0.7 mL), se añadió ascorbato sódico (5 mg, 0.023 mmol) y se agitó a t.a. 15 min. b) Reacción CuAAC: Sobre una disolución de azido-POSS **6** (100 mg, 0.092 mmol) y 4,4-difluoro-8-(4'-ethinilfenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (**7a**) (3.7 mg, 9.180  $\mu\text{mol}$ ) en THF/ $\text{H}_2\text{O}$  9:1 (5.3 mL), se añadió la disolución del complejo de cobre previamente formado. La mezcla se agitó toda la noche a t.a., se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), se extrajo con  $\text{H}_2\text{O}$  ( $2 \times 5$  mL) y la fracción orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ ) empleando primero hexano/AcOEt (15:1) para recuperar el producto de partida en exceso **6** (71.4 mg, 80% calculado con respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/AcOEt (5:1) para dar **7** como un aceite rojo viscoso (6.5 mg, 48%).

**Método D** (con  $(\text{IPr})\text{CuCl}$ ): A una disolución de azido-POSS **6** (113 mg, 0.104 mmol) y 4,4-difluoro-8-(4'-ethinilfenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (**7a**) (4.2 mg, 0.01 mmol) en tolueno (1 mL), bajo atmósfera de argón, se adicionó  $(\text{IPr})\text{CuCl}$  (0.5 mg, 0.001 mmol) y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (5.41  $\mu\text{L}$ , 0.031 mmol). La mezcla se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 11 h, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ ) empleando primero hexano/AcOEt (15:1) hasta recuperar el producto de partida en exceso **6** (98.1 mg, 97% calculado respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/AcOEt (5:1) para dar **7** como un aceite rojo viscoso (8.8 mg, 57%).

**Método E** (con  $[\text{Cu}(\text{C18}_{\text{tren}})]\text{Br}$ ): A una disolución de azido-POSS **6** (134 mg, 0.123 mmol) y 4,4-difluoro-8-(4'-ethinilfenil)-1,3,5,7-tetrametil-2,6-dietil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (**7a**) (5 mg, 0.012 mmol) en tolueno (1 mL) bajo atmósfera de argón, se añadieron  $[\text{Cu}(\text{C18}_{\text{tren}})]\text{Br}$  (2.2 mg, 0.001 mmol) y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (6.5  $\mu\text{L}$ , 0.037 mmol). La mezcla se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 6 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ ) empleando primero hexano/AcOEt (12:1) para recuperar el producto de partida en exceso **6** (113 mg, 94% calculado respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/AcOEt (5:1) para dar **7** como un aceite rojo viscoso (15.1 mg, 82%).

$R_f = 0.61$  (hexano/AcOEt 5:3).

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.71-0.76 (m, 14H, Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.83-0.98 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.97 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.34 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-C1, CH<sub>3</sub>-C7), 1.66-1.74 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.06-2.13 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.30 (q, 4H, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.54 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-C3, CH<sub>3</sub>-C5), 3.26 (td, 14H, J = 6.8 Hz; 1.42 Hz, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 4.43 (t, 2H, J = 7.11 Hz, CH<sub>2</sub>-N=N), 7.36 (d, 2H, J<sub>AB</sub> = 8.4 Hz, 2×CH fenilo), 7.97 (d, 2H, J<sub>AB</sub> = 8.4 Hz, 2×CH fenilo), 7.86 (s, 1H, in 1,2,3-triazol).

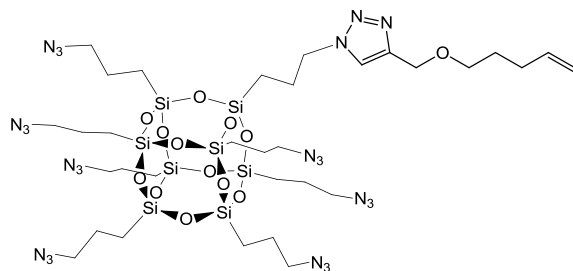
**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 12.6 (CH<sub>3</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>), 14.9 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.3 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 22.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 24.4 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.8 (CH<sub>2</sub>-N=N), 53.5 (CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 120.1 (CH de 1,2,3-triazol), 126.4 (CH fenilo), 129.2 (CH fenilo), 130.9, 131.3, 133.0, 135.9, 138.5, 139.8 (C in 1,2,3-triazol), 147.4, 154.1.

**<sup>29</sup>Si RMN** (79.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -66.92, -66.97, -67.53 (3:4:1 intensidades relativas).

**UV/Vis** (AcOEt): λ<sub>max</sub>(ε) = 523 nm (47427 mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>).

**HRMS (ESI)**: calculado para C<sub>49</sub>H<sub>75</sub>N<sub>26</sub>O<sub>12</sub>Si<sub>8</sub>BF<sub>2</sub>: 1493.4356 [M+H]<sup>+</sup>, encontrado 1493.4333

### Compuesto 8



**Método E:** Sobre una disolución de **8a** (3 mg, 0.024 mmol) y azido-POSS **6** (263 mg, 0.242 mmol) en tolueno (1 mL), se adicionaron [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br (4.36 mg, 2.416 μmol) y *i*Pr<sub>2</sub>NEt (13 μL, 0.072 mmol) bajo argón. La mezcla se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 3 h, el crudo se disolvió con hexano (40 mL) y se extrajo con acetonitrilo (3×40 mL) para eliminar el catalizador de cobre. Las fracciones de acetonitrilo se evaporaron a presión reducida y el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>) empleando primero hexano/AcOEt (12:1) hasta recuperar el producto de partida en exceso **6** (87% calculado con respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/AcOEt (2:1) para dar **8** como un aceite amarillento (14.8 mg, 51%).

**R<sub>f</sub>** = 0.49 (hexano/AcOEt 3:2).

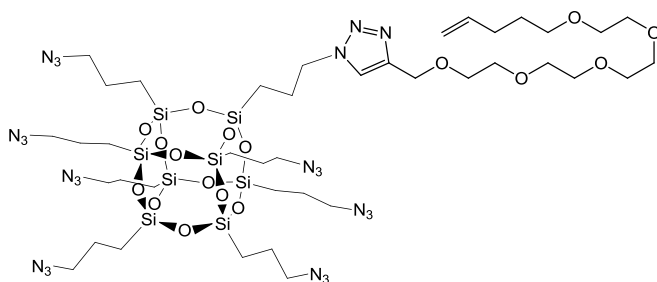
**<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.65-0.70 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 0.70-0.76 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1.65-1.75 (m, 16H, 7×SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.97-2.05 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.09-2.15 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.27 (t, 14H, *J* = 6.8 Hz, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.55 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.34 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.62 (s, 2H, CCH<sub>2</sub>O), 4.96 (ddt, 1H, *J* = 10.2, 2.2, 1.3 Hz, CH=CH<sub>cis</sub>H), 5.01 (ddd, 1H, *J* = 17.1, 2.2, 1.7 Hz, CH=CHH<sub>trans</sub>), 5.81 (ddt, 1H, *J*=17.1, 10.2, 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 7.53 (s, 1H, CH triazol).

**<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.1 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 9.2 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 22.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 24.2 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 28.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 30.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.4 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 53.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 64.6 (CCH<sub>2</sub>O), 70.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 115.0 (CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 122.3 (CH en 1,2,3 triazol), 138.3 (CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 145.6 (C en 1,2,3 triazol).

**<sup>29</sup>Si RMN** (79.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -66.93, -66.97, -67.57.

**HRMS (ESI)**: calculado para C<sub>32</sub>H<sub>60</sub>N<sub>24</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>8</sub>: 1212,2926 [M+H<sup>+</sup>], encontrado: 1213.2964.

### Compuesto 9



**Método E:** Sobre una disolución de **9a** (8.5 mg, 0.028 mmol) y azido-POSS **6** (308 mg, 0.283 mmol) en tolueno (1 mL) bajo argón, se añadieron [Cu(C18tren)]Br (5.11 mg, 2.83 μmol) y *i*Pr<sub>2</sub>NEt (15 μL, 0.085 mmol). La mezcla se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 2 h, el crudo se disolvió con hexano (40 mL) y se extrajo con acetonitrilo (3×40 mL). Las fracciones combinadas de acetonitrilo se concentraron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>) empleando primero hexano/AcOEt (12:1) hasta recuperar el producto de partida en exceso **6** (99% calculado con respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/AcOEt (1:2) para dar **9** como un aceite amarillento (29 mg, 74%).

**R<sub>f</sub>** = 0.23 (hexano/ AcOEt 1:2).

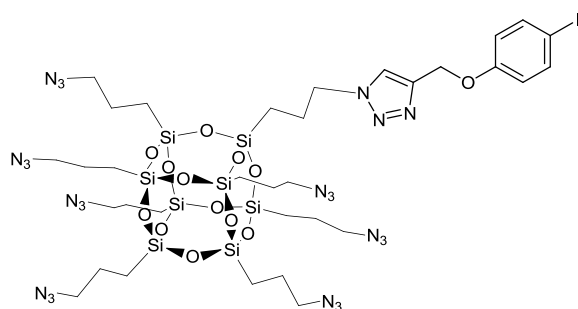
**<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.63-0.70 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 0.70-0.77 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1.63-1.75 (m, 16H, 7×SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.97-2.06 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.07-2.14 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.27 (t, 14H, *J* = 6.9 Hz, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.46 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.55-3.77 (m, 16H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.34 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.69 (s, 2H, CCH<sub>2</sub>O), 4.95 (ddt, 1H, *J* = 10.2, 2.2, 1.3 Hz, CH=CH<sub>cis</sub>H), 5.01 (dddd, 1H, *J* = 17.1, 2.2, 1.6, 0.4 Hz, CH=CHH<sub>trans</sub>), 5.81 (ddt, 1H, *J* = 17.1, 10.2, 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 7.59 (s, 1H, CH triazol).

**<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.1 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N) y (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 22.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 24.1 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 28.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 30.4 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 53.5 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 53.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 64.9 (CCH<sub>2</sub>O), 70.0, 70.2, 70.7, 70.7, 70.7 y 70.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 114.8 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 128.1 (CH en 1,2,3 triazol), 138.4 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 155.3 (C en 1,2,3 triazol).

**<sup>29</sup>Si RMN** (79.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -66.93, -66.98, -67.50.

**HRMS (ESI)**: calculado para C<sub>40</sub>H<sub>76</sub>N<sub>24</sub>O<sub>17</sub>Si<sub>8</sub>: 1388.4052 [M+H<sup>+</sup>], encontrado: 1389.4025.

### Compuesto 10



**Método E:** Sobre una disolución de **10a** (5 mg, 0.019 mmol) y azido-POSS **6** (211 mg, 0.194 mmol) en tolueno (1 mL) bajo argón, se añadieron [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br (3.50 mg, 1.938 μmol) y *i*Pr<sub>2</sub>NEt (10.12 μL, 0.058 mmol). La mezcla se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 2 h, el crudo se disolvió en hexano (40 mL) y se extrajo con acetonitrilo (3×40 mL). Las fracciones combinadas de acetonitrilo se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>) empleando primero hexano/AcOEt (12:1) hasta recuperar el producto de partida en exceso **6** (89% calculado respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/ AcOEt t (3:1) para dar **10** como un aceite amarillento (22.7 mg, 87%).

**R<sub>f</sub>** = 0.42 (hexano/AcOEt 1:2).

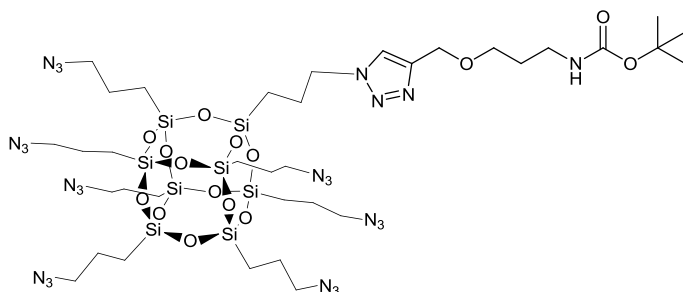
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.64-0.70 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 0.70-0.77 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1.64-1.75 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1.98-2.07 (m, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.24-3.30 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 4.35 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 5.17 (s, 2H, CCH<sub>2</sub>O), 6.78 (d, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 8.9 Hz, C<sub>ar</sub>H 2 y 6), 7.57 (d, 2H, *J*<sub>AB</sub> = 8.9 Hz, C<sub>ar</sub>H 3 y 5), 7.60 (s, 1H, CH triazol).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.1 (SiCH<sub>2</sub>), 22.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 24.2 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 52.6 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 53.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 62.2 (CCH<sub>2</sub>O), 83.6 (C<sub>Ar</sub>I), 117.3 (C<sub>Ar</sub>H 2 y 6), 122.8 (CH en 1,2,3 triazol), 138.5 (C<sub>Ar</sub>H 3 y 5), 143.9 (C in 1,2,3 triazol), 158.2 (C<sub>Ar</sub>O).

**<sup>29</sup>Si RMN** (79.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -66.93, -66.97, -67.57.

**HRMS (ESI):** calculado para C<sub>33</sub>H<sub>55</sub>N<sub>24</sub>O<sub>13</sub>Si<sub>8</sub>: 1346.1652 [M+H<sup>+</sup>]; encontrado: 1347.1687.

### Compuesto 11



**Método E:** Sobre una disolución de **11a** (4 mg, 0.019 mmol) y azido-POSS **6** (204 mg, 0.188 mmol) en tolueno (1 mL) bajo argón, se añadieron [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br (3.38 mg, 1.876 μmol) y *i*Pr<sub>2</sub>NEt (9.80 μL, 0.056 mmol). La mezcla se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 1.7 h. El crudo se disolvió en hexano (40 mL) y se extrajo con acetonitrilo (3×40 mL). Las fracciones combinadas de acetonitrilo se concentraron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía flash en columna (SiO<sub>2</sub>) empleando primero hexano/AcOEt (12:1) paraa recuperar el producto de partida en exceso **6** (96% calculado con respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/ AcOEt (1:1) para dar **11** como un aceite amarillento (15.5 mg, 64%).

**R<sub>f</sub>** = 0.21 (hexano/ AcOEt 1:1).

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.64-0.70 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 0.70-0.77 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 1.64-1.74 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), δ=1.78 (m,

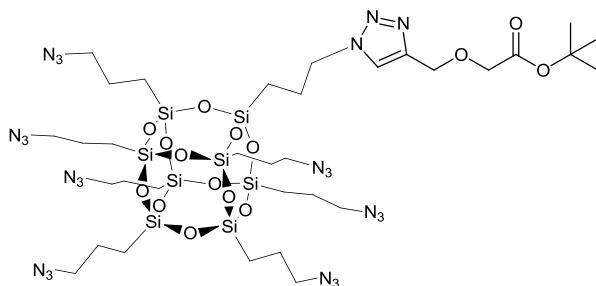
$^1\text{H}$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 1.97-2.07 (m, 2H,  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 3.20-3.25 (m, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.27 (t, 14H,  $J=6.8$  Hz,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 3.60 (t, 2H,  $J=6.2$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.34 (t, 2H,  $J=7.2$  Hz,  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 4.62 (s, 2H,  $\text{CCH}_2\text{O}$ ), 4.79 (s, 1H,  $\text{NH}$ ), 7.54 (s, 1H,  $\text{CH}$  triazol).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.1 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 9.2 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 22.6 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 24.2 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 28.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 30.0 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 38.3 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ ), 52.5 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 53.6 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 64.7 ( $\text{CCH}_2\text{O}$ ), 68.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 79.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 122.4 ( $\text{CH}$  en 1,2,3, triazol), 145.4 ( $\text{C}$  en 1,2,3 triazol), 156.1 ( $\text{NHCOO}$ ).

$^{29}\text{Si}$  RMN (79.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -66.92, -66.97, -67.51.

**HRMS (ESI):** calculado para  $\text{C}_{35}\text{H}_{67}\text{N}_{25}\text{O}_{15}\text{Si}_8$ : 1301.3475 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], encontrado: 1302.3532.

### Compuesto 12



**Método E:** A una disolución de **12a** (3 mg, 0.018 mmol) y azido-POSS **6** (192 mg, 0.176 mmol) en tolueno (1 mL) bajo argón, se añadieron  $[\text{Cu}(\text{C}_{18}\text{tren})]\text{Br}$  (3.18 mg, 1.763  $\mu\text{mol}$ ) y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (9.21  $\mu\text{L}$ , 0.053 mmol). La mezcla se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 2 h. El crudo se disolvió con hexano (40 mL) y se extrajo con acetonitrilo (3×40 mL). Las fases combinadas de acetonitrilo se concentraron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía flash en columna ( $\text{SiO}_2$ ) empleando primero hexano/ $\text{AcOEt}$  (12:1) para recuperar el producto de partida sin reaccionar **6** (94% calculado con respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/ $\text{AcOEt}$  (2:1) para dar **12** como un aceite amarillento (18.5 mg, 83%).

$R_f$  = 0.17 (hexano/  $\text{AcOEt}$  2:1).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.62-0.69 (m, 2H,  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 0.69-0.78 (m, 14H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1.48 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 1.65-1.75 (m, 14H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1.97-2.07

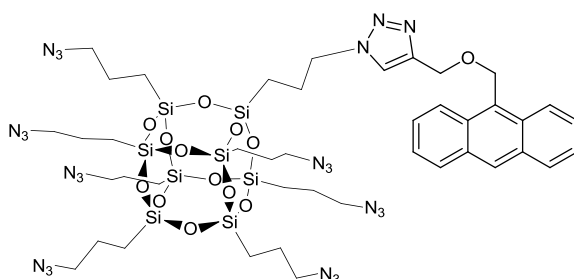
(m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.27 (t, 14H, *J* = 6.8 Hz, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 4.07 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>COO), 4.34 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.75 (s, 2H, CCH<sub>2</sub>O), 7.62 (s, 1H, CH triazol).

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.1 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 9.2 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 22.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 24.2 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 52.5 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 53.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 64.8 (CCH<sub>2</sub>O), 68.2 (OCH<sub>2</sub>COO), 82.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 122.9 (CH en 1,2,3 triazol), 144.7 (C en 1,2,3 triazol), 169.5 (CH<sub>2</sub>COO).

<sup>29</sup>Si RMN (79.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -66.93, -66.99, -67.53.

HRMS (ESI): calculado para C<sub>33</sub>H<sub>62</sub>N<sub>24</sub>O<sub>15</sub>Si<sub>8</sub>: 1258.3053 [M+H<sup>+</sup>], encontrado: 1259.3026.

### Compuesto 13



**Método E:** Sobre una disolución de **13a** (5 mg, 0.020 mmol) y azido-POSS **6** (221 mg, 0.203 mmol) en tolueno (1 mL) bajo argón, se añadieron [Cu(C18<sub>6</sub>tren)]Br (3.66 mg, 2.030 μmol) y *i*Pr<sub>2</sub>NEt (10.61 μL, 0.061 mmol). La mezcla se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 3 h. El crudo se disolvió en hexano (40 mL) y se extrajo con acetonitrilo (3×40 mL). Las fases combinadas de acetonitrilo se evaporaron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía flash en columna (SiO<sub>2</sub>) empleando primero hexano/AcOEt (12:1) para recuperar el producto de partida **6** (85% calculado con respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/ AcOEt (2:1) para dar **13** como un aceite amarillento (18.3 mg, 68%).

*R<sub>f</sub>* = 0.18 (hexano/ AcOEt 2:1).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.64-0.78 (m, 16H, SiCH<sub>2</sub>), 1.58-1.75 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1.97-2.07 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.21 (t, 6H, *J*=6.8 Hz, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.26 (t, 8H, *J* = 6.8 Hz, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 4.33 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.88 (s, 2H, CCH<sub>2</sub>O), 5.61 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>C<sub>Ar</sub>), 7.44-7.56 (m, 5H, C<sub>Ar</sub>H 2, 3,



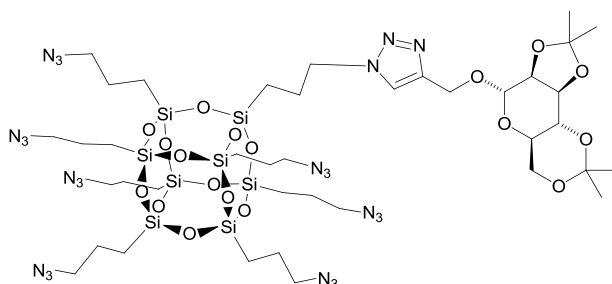
6 y 7;  $CH$  triazol), 8.02 (d, 2H,  $J = 8.3$  Hz,  $C_{Ar}H$  4 y 5), 8.35 (d, 2H,  $J = 8.9$  Hz,  $C_{Ar}H$  1 y 8), 8.48 (s, 1H,  $C_{Ar}H$  10).

$^{13}C$  RMN (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  9.1 ( $SiCH_2$ ), 22.6 ( $SiCH_2CH_2CH_2N_3$ ), 24.1 ( $Si^*CH_2CH_2CH_2N$ ), 52.3 ( $Si^*CH_2CH_2CH_2N$ ), 53.4 ( $SiCH_2CH_2CH_2N_3 \times 3$ ), 53.5 ( $SiCH_2CH_2CH_2N_3 \times 4$ ), 64.2 ( $CCH_2O$ ), 64.8 ( $OCH_2C_{Ar}$ ) 122.6 ( $CH$  en 1,2,3 triazol), 124.4 ( $C_{Ar}$  1 y 8), 125.1 ( $C_{Ar}$  3 y 6), 126.4 ( $C_{Ar}$  2 y 7), 128.4 ( $C_{Ar}$  9), 129.2 ( $C_{Ar}$  4 y 5), 131.0 ( $C_{Ar}$  10), 131.1 ( $C_{Ar}$  1a y 8a), 131.6 ( $C_{Ar}$  4a y 5a), 146.6 ( $C$  en 1,2,3 triazol).

$^{29}Si$  RMN (79.5 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  -66.94, -67.00, -67.53.

**HRMS (ESI):** calculado para  $C_{42}H_{62}N_{24}O_{13}Si_8$ : 1334.3082 [ $M+H^+$ ], encontrado: 1336.3130.

### Compuesto 14



**Método A:** A una disolución de 2,3:4,6-di-*O*-isopropilidene- $\alpha$ -D-mannopyranosido de propargilo **14a** (3.2 mg, 0.011 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (5 mL), se añadió azido-POSS **6** (120 mg, 0.11 mmol), seguido de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (0.990 mg, 0.004 mmol) y ascorbato sódico (3.4 mg, 0.020 mmol) en agua (5 mL). Tras agitar durante 15 h a t.a. se extrajo el crudo con  $CH_2Cl_2$  (3 $\times$ 5 mL), se secó ( $Na_2SO_4$ ) y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía flash en columna ( $SiO_2$ ) empleando hexano/ $AcOEt$  (15:1) para recuperar el producto de partida **6** (60 mg, 55% calculado respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/ $AcOEt$  (3:1) para dar **14** como un aceite incoloro (1.5 mg, 10%).

**Método E:** A una disolución de azido-POSS **6** (120 mg, 0.11 mmol) y 2,3:4,6-di-*O*-isopropilidene- $\alpha$ -D-mannopyranosido **14a** (3.2 mg, 0.011 mmol) en tolueno (3 mL), se añadieron  $[Cu(C18_{tren})]Br$  (2.2 mg, 0.001 mmol) y  $iPr_2NEt$  (6.5 mL, 0.037 mmol). La mezcla se calentó bajo irradiación con microondas a 80 °C durante 6 h, se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el residuo por cromatografía flash en columna ( $SiO_2$ ) empleando primero hexano/ $AcOEt$  (15:1) para recuperar el producto de partida sin reaccionar **6** (97.2 mg,

90% calculado respecto al 90% de exceso), seguido de hexano/AcOEt (3:1) para dar **14** como un aceite incoloro (12 mg, 79%).

$[\alpha]_D^{20} = +18.00$  ( $c = 1.2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

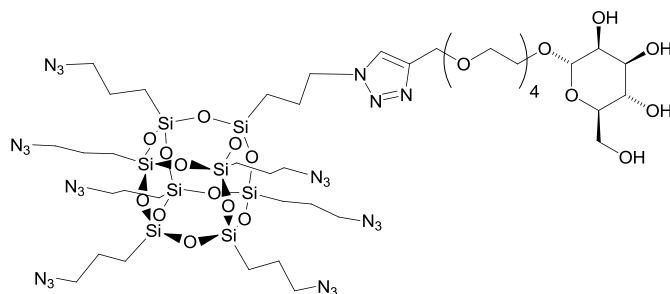
$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.60–0.80 (m, 16H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.33 (s, 24 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.43 (s, 24 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.53 (s, 24 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.54 (s, 24 H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.63–1.81 (m, 14 H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 1.94–2.13 (m, 2 H,  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.27 (t, 14H,  $J = 6.8$  Hz,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 3.63 (dt, 1 H,  $J = 5.6, 10.5$  Hz,  $H-5a$ ), 3.76 (dd,  $J = 7.7, 10.5$  Hz,  $H-4a$ ), 3.72–3.83 (m, 1H,  $H-6a$ ), 3.91 (dd, 1H,  $J = 5.6, 10.5$  Hz,  $H-6a$ ), 4.14 (dd, 1H,  $J = 5.7, 7.7$  Hz,  $H-3a$ ), 4.20 (d, 1H,  $J = 5.7$  Hz,  $H-2a$ ), 4.35 (t, 2 H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4.64 (d, 1H,  $J = 12.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}-1a$ ), 4.82 (d, 1H,  $J = 12.2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}-1a$ ), 5.14 (s, 1H,  $H-1a$ ), 7.72 (s, 1H, CH en 1,2,3-triazol).

$^{13}\text{C RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  9.00 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 20.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.4 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 24.0 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 26.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 29.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 52.4 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 53.4 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 60.3 ( $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}-1a$ ), 61.6 (C-5a), 62.0 (C-6a), 72.6 (C-4a), 74.8 (C-3a), 75.9 (C-2a), 97.0 (C-1a), 99.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 109.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 122.7 (CH en 1,2,3-triazol), 143.7 (C en 1,2,3 triazol).

$^{29}\text{Si RMN}$  (79.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -66.9, -67.6, -67.6.

**HR-MS (ESI)**: calculado para  $\text{C}_{39}\text{H}_{70}\text{N}_{24}\text{O}_{18}\text{Si}_8$   $[(\text{M}+\text{H})^+]$  1388.8071, encontrado 1788.5241.

### Compuesto 15



**Método C:** Sobre una disolución de azido-POSS **6** (120 mg, 0.11 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.5 mL), se añadió una disolución de 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-inil- $\alpha$ -D-mannopyranosa **15a** (3.3 mg, 0.011 mmol), en agua (2.5 mL), seguido de una mezcla de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1.25 mg, 0.005 mmol), ascorbato sódico (5 mg, 0.025 mmol) y  $(\text{BimC}_4\text{A})_3$  (8.22 mg, 0.001 mmol) en agua (2.5 mL). Tras agitar durante 2 h a t.a., se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo

resultante se purificó por cromatografía flash en columna (SiO<sub>2</sub>) empleando primero hexano/AcOEt (15:1) para recuperar el producto de partida sin reaccionar **6** (60 mg, 55% calculado respecto al 90% de exceso), seguido de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (7:1) para dar **15** como un aceite incoloro (10.2 mg, 63%).

$[\alpha]_D^{20} = +22.7$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>).

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.63-0.82 (m, 16H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.61-1.77 (m, 14 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 1.93-2.07 (m, 2 H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.28 (t, 14H,  $J = 6.8$  Hz, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.60-3.67 (m, 17H), 3.78-3.93 (m, 5H), 3.98 (s, 1H, -OH), 4.25-4.40 (m, 2 H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O-C-1a), 4.92 (s, 1H, H-1a), 7.60 (s, 1H, CH en 1,2,3-triazol).

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9.00 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 22.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 24.0 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.5 (Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 53.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 62.2, 64.0, 67.0, 68.3, 69.8, 100.2 (C-1a).

**<sup>29</sup>Si RMN** (79.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  -66.9, -67.00, -67.4.

**HR-MS (ESI)**: calculado para C<sub>41</sub>H<sub>78</sub>N<sub>24</sub>O<sub>22</sub>Si<sub>8</sub> [(M+H)<sup>+</sup>] 1484.8896, encontrado 1484.1977.

### Referencias

- [1] H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [2] a) D. B. Cordes, P. D. Lickiss and F. Rataboul, *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2081-2173; b) P. D. Lickiss and F. Rataboul in *Fully condensed polyhedral oligosilsesquioxanes(POSS): From synthesis to application*, Vol. 57 Eds.: A. F. Hill and M. J. Fink), **2008**, pp. 1-116.
- [3] a) R. M. Laine, *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 3725-3744; b) R. M. Laine and M. F. Roll, *Macromolecules* **2011**, *44*, 1073-1109; c) R. M. Laine, C. X. Zhang, A. Sellinger and L. Viculis, *Applied Organometallic Chemistry* **1998**, *12*, 715-723; d) S.-W. Kuo and F.-C. Chang, *Progress in Polymer Science* **2011**, *36*, 1649-1696; e) F. Wang, X. Lu and C. He, *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 2775-2782.
- [4] a) R. Muller, R. Kohne and S. Sliwinski, *Journal Fur Praktische Chemie* **1959**, *9*, 71-74; b) C. L. Frye and W. T. Collins, *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92*, 5586-&; c) P. A. Agaskar, *Inorganic Chemistry* **1991**, *30*, 2707-2708; d) G. Calzaferri, D. Herren and R. Imhof, *Helvetica Chimica Acta* **1991**, *74*, 1278-1280.
- [5] a) K. A. Andrianov, N. M. Petrovnina, T. V. Vasileva, V. E. Shklover and B. I. Dyachenko, *Zhurnal Obshchei Khimii* **1978**, *48*, 2692-2695; b) F. J. Feher, D. Soulivong, A. G. Eklund and K. D. Wyndham, *Chemical Communications* **1997**, 1185-1186; c) P. G. Harrison and C. Hall, *Main Group Metal Chemistry* **1997**, *20*, 515-529; d) B. W. Manson, J. J. Morrison, P. I. Coupar, P. A. Jaffres and R. E. Morris, *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **2001**, 1123-1127; e) Y. Itami, B. Marciniec and M. Kubicki, *Chemistry-a European Journal* **2004**, *10*, 1239-1248; f) E. O. Dare, L.-K. Liu and J. Peng, *Dalton Transactions* **2006**, 3668-3671; g) G. Cheng, N. R. Vautravers, R. E. Morris and D. J. Cole-Hamilton, *Organic &*

- Biomolecular Chemistry* **2008**, *6*, 4662-4667; h) S. Sulaiman, A. Bhaskar, J. Zhang, R. Guda, T. Goodson, III and R. M. Laine, *Chemistry of Materials* **2008**, *20*, 5563-5573; i) P. Zak, B. Marciniec, M. Majchrzak and C. Pietraszuk, *Journal of Organometallic Chemistry* **2011**, *696*, 887-891.
- [6] a) K. Olsson, *Ark. Kemi* **1958**, *13*, 367-378; b) A. R. Bassindale, Z. H. Liu, I. A. MacKinnon, P. G. Taylor, Y. X. Yang, M. E. Light, P. N. Horton and M. B. Hursthouse, *Dalton Transactions* **2003**, 2945-2949; c) M. Kozelj and B. Orel, *Dalton Transactions* **2008**, 5072-5075.
- [7] a) V. Ervithayasuporn, X. Wang and Y. Kawakami, *Chemical Communications* **2009**, 5130-5132; b) U. Dittmar, B. J. Hendan, U. Florke and H. C. Marsmann, *Journal of Organometallic Chemistry* **1995**, *489*, 185-194; c) S. Lucke, K. StoppekLangner, B. Krebs and M. Lage, *Zeitschrift Fur Anorganische Und Allgemeine Chemie* **1997**, *623*, 1243-1246; d) A. Gultek, T. Seckin and H. I. Adiguzel, *Turkish Journal of Chemistry* **2005**, *29*, 391-399; e) Y. Liu, X. Yang, W. Zhang and S. Zheng, *Polymer* **2006**, *47*, 6814-6825; f) B. Marciniec, M. Dutkiewicz, H. Maciejewski and M. Kubicki, *Organometallics* **2008**, *27*, 793-794; g) S. Fabritz, D. Heyl, V. Bagutski, M. Empting, E. Rikowski, H. Frauendorf, I. Balog, W.-D. Fessner, J. J. Schneider, O. Avrutina and H. Kolmar, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 2212-2218; h) D. Heyl, E. Rikowski, R. C. Hoffmann, J. J. Schneider and W.-D. Fessner, *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 5509-5509.
- [8] a) M. C. Gravel and R. M. Laine, **1997**, pp. POLY-194; b) F. J. Feher and K. D. Wyndham, *Chemical Communications* **1998**, 323-324; c) F. J. Feher, K. D. Wyndham, M. A. Scialdone and Y. Hamuro, *Chemical Communications* **1998**, 1469-1470; d) F. J. Feher, K. D. Wyndham, D. Soulivong and F. Nguyen, *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1999**, 1491-1497.
- [9] S. Fabritz, S. Hoerner, O. Avrutina and H. Kolmar, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 2224-2236.
- [10] C. Marcolli and G. Calzaferri, *Applied Organometallic Chemistry* **1999**, *13*, 213-226.
- [11] a) in *Applications of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes*, Vol. 3 (Ed. C. Hartmann-Thompson), Springer Netherlands, **2011**; b) K. Tanaka and Y. Chujo, *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 1733-1746; c) K. Tanaka and Y. Chujo, *Polymer Journal* **2013**, *45*, 247-254; d) H. Ghanbari, B. G. Cousins and A. M. Seifalian, *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, *32*, 1032-1046; e) K.-Y. Pu and B. Liu, *Advanced Functional Materials* **2011**, *21*, 3408-3423; f) F. Olivero, F. Reno, F. Carniato, M. Rizzi, M. Cannas and L. Marchese, *Dalton Transactions* **2012**, *41*, 7467-7473.
- [12] a) R. M. Laine, M. Roll, M. Asuncion, S. Sulaiman, V. Popova, D. Bartz, D. J. Krug and P. H. Mutin, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2008**, *46*, 335-347; b) M. Z. Asuncion, M. Ronchi, H. Abu-Seir and R. M. Laine, *Comptes Rendus Chimie* **2010**, *13*, 270-281; c) Y. Li, W.-B. Zhang, I. F. Hsieh, G. Zhang, Y. Cao, X. Li, C. Wesdemiotis, B. Lotz, H. Xiong and S. Z. D. Cheng, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 10712-10715.
- [13] Hay algunos silsesquioxanos tipo Janus comercialmente disponibles en Mayaterials (<http://www.mayaterials.com>)
- [14] M. Z. Asuncion and R. M. Laine, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 3723-3736.
- [15] a) B. J. Hendan and H. C. Marsmann, *Journal of Organometallic Chemistry* **1994**, *483*, 33-38; b) S. Kraus-Ophir, I. Jerman, B. Orel and D. Mandler, *Soft Matter* **2011**, *7*, 8862-8869; c) C. Chen, S. Huang, M. Chen and Q. Lu, *High Performance Polymers* **2012**, *24*, 119-124.
- [16] a) Z. Li and Y. Kawakami, *Chemistry Letters* **2008**, *37*, 804-805; b) J. H. Jung and R. M. Laine, *Macromolecules* **2011**, *44*, 7263-7272.
- [17] S. Tateyama, Y. Kakihana and Y. Kawakami, *Journal of Organometallic Chemistry* **2010**, *695*, 898-902.

- [18] a) F. J. Feher, D. A. Newman and J. F. Walzer, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 1741-1748; b) S. T. Iacono, A. Vij, W. Grabow, D. W. Smith, Jr. and J. M. Mabry, *Chemical Communications* **2007**, 4992-4994; c) P. Zak, C. Pietraszuk, B. Marciniec, G. Spolnik and W. Danikiewicz, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2009**, *351*, 2675-2682; d) Y.-C. Lin and S.-W. Kuo, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2011**, *49*, 2127-2137; e) H. Liu, M. Puchberger and U. Schubert, *Chemistry-a European Journal* **2011**, *17*, 5019-5023; f) B. M. Moore, S. M. Ramirez, G. R. Yandek, T. S. Haddad and J. M. Mabry, *Journal of Organometallic Chemistry* **2011**, 696, 2676-2680; g) W. Wang, Q. Shen, W. Zha and G. Zhu, *Journal of Polymer Research* **2011**, *18*, 1119-1124; h) J. K. Hu, Q. C. Zhang and S. L. Gong, *Chinese Chemical Letters* **2012**, *23*, 181-184; i) S. C. Kettwich, S. N. Pierson, A. J. Peloquin, J. M. Mabry and S. T. Iacono, *New Journal of Chemistry* **2012**, *36*, 941-946; j) Y. Zheng, L. Wang and S. Zheng, *European Polymer Journal* **2012**, *48*, 945-955.
- [19] H. Araki and K. Naka, *Macromolecules* **2011**, *44*, 6039-6045.
- [20] a) C. X. Zhang and R. M. Laine, *Journal of Organometallic Chemistry* **1996**, *521*, 199-201; b) A. Tsuchida, C. Bolln, F. G. Sernetz, H. Frey and R. Mulhaupt, *Macromolecules* **1997**, *30*, 2818-2824; c) F. J. Feher, K. D. Wyndham, R. K. Baldwin, D. Soulivong, J. D. Lichtenhan and J. W. Ziller, *Chemical Communications* **1999**, 1289-1290; d) R. Knischka, F. Dietsche, R. Hanselmann, H. Frey, R. Mulhaupt and P. J. Lutz, *Langmuir* **1999**, *15*, 4752-4756; e) M. A. Said, H. W. Roesky, C. Rennekamp, M. Andruh, H.-G. Schmidt and M. Noltemeyer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 661-664; f) N. Auner, J. W. Bats, D. E. Katsoulis, M. Suto, R. E. Tecklenburg and G. A. Zank, *Chemistry of Materials* **2000**, *12*, 3402-3418; g) A. R. Bassindale, D. J. Parker, P. G. Taylor and A. C. Watt, *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **2003**, *81*, 1341-1349; h) C. McCusker, J. B. Carroll and V. M. Rotello, *Chemical Communications* **2005**, 996-998; i) K. Tanaka, K. Inafuku and Y. Chujo, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 10029-10033; j) S.-y. Kuwahara, K. Yamamoto and J.-i. Kadokawa, *Chemistry Letters* **2010**, *39*, 1045-1047; k) X. Yu, S. Zhong, X. Li, Y. Tu, S. Yang, R. M. Van Horn, C. Ni, D. J. Pochan, R. P. Quirk, C. Wesdemiotis, W.-B. Zhang and S. Z. D. Cheng, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16741-16744; l) W.-B. Zhang, Y. Li, X. Li, X. Dong, X. Yu, C.-L. Wang, C. Wesdemiotis, R. P. Quirk and S. Z. D. Cheng, *Macromolecules* **2011**, *44*, 2589-2596; m) Y. Li, X.-H. Dong, K. Guo, Z. Wang, Z. Chen, C. Wesdemiotis, R. P. Quirk, W.-B. Zhang and S. Z. D. Cheng, *Acs Macro Letters* **2012**, *1*, 834-839; n) H. Lin, X. Wan, X. Jiang, Q. Wang and J. Yin, *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 2616-2623; o) S. Hoerner, S. Fabritz, H. D. Herce, O. Avrutina, C. Dietz, R. W. Stark, M. C. Cardoso and H. Kolmar, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 2258-2265.
- [21] E. A. Rebrov, N. A. Tebeneva, A. M. Mouzafarov, Y. E. Ovchinnikov, Y. T. Struchkov and T. V. Strelkova, *Russian Chemical Bulletin* **1995**, *44*, 1286-1292.
- [22] B. Trastoy, M. Eugenia Perez-Ojeda, R. Sastre and J. Luis Chiara, *Chemistry-a European Journal* **2010**, *16*, 3833-3841.
- [23] J. Ramon Suarez, B. Trastoy, M. Eugenia Perez-Ojeda, R. Marin-Barrios and J. Luis Chiara, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2010**, *352*, 2515-2520.
- [24] a) C. W. Tornoe and M. Meldal, **2001**, pp. 263-264; b) C. W. Tornoe, C. Christensen and M. Meldal, *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064; c) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599; d) M. Meldal and C. W. Tornoe, *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 2952-3015.
- [25] M. Eugenia Perez-Ojeda, B. Trastoy, I. Lopez-Arbeloa, J. Banuelos, A. Costela, I. Garcia-Moreno and J. Luis Chiara, *Chemistry-a European Journal* **2011**, *17*, 13258-13268.
- [26] B. Trastoy, D. A. Bonsor, M. Eugenia Perez-Ojeda, M. Luisa Jimeno, A. Mendez-Ardoy, J. M. Garcia Fernandez, E. J. Sundberg and J. L. Chiara, *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 3191-3201.
- [27] D. M. Simons, *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 3-8.

- [28] Este caso ocurre rara vez en las moléculas reales, especialmente en el caso de que presenten ya un alto grado de sustitución debido a que el impedimento estérico provoca que todas las posiciones no sean reactivas en la misma medida. Hay que considerar por ello que la relación de productos polisustituídos está sobreestimado en esta aproximación.
- [29] No es sorprendente que en los ejemplos descritos en la literatura de monofuncionalización selectiva de un POSS homo-octafuncional empleando una estequiometría 1:1 rara vez exceda el 30% de rendimiento aislado.
- [30] La octaazida **6** de carácter más bien lipófilo es un sustrato ideal en este contexto ya que en la transformación de cada azida para dar un 1,2,3-triazol se produce un incremento significativo en la polaridad de la molécula lo que nos facilita la separación cromatográfica del POSS sin reaccionar con respecto al producto monosustituído y también de todos los posibles politriazolil derivados que se pueden formar en la reacción de click ya que todos ellos tendrán mayor polaridad y por tanto una movilidad muy inferior en columnas de cromatografía en sílica de fase normal.
- [31] a) V. O. Rodionov, V. V. Fokin and M. G. Finn, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 2210-2215; b) V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. D. Diaz, V. V. Fokin and M. G. Finn, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 12705-12712.
- [32] B.-Y. Lee, S. R. Park, H. B. Jeon and K. S. Kim, *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 5105-5109.
- [33] J. Raushel and V. V. Fokin, *Organic Letters* **2010**, *12*, 4952-4955.
- [34] a) V. Jurkauskas, J. P. Sadighi and S. L. Buchwald, *Organic Letters* **2003**, *5*, 2417-2420; b) S. Diez-Gonzalez, A. Correa, L. Cavallo and S. P. Nolan, *Chemistry-a European Journal* **2006**, *12*, 7558-7564.
- [35] V. O. Rodionov, S. I. Presolski, S. Gardinier, Y.-H. Lim and M. G. Finn, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 12696-12704.
- [36] a) G. Barre, D. Taton, D. Lastcoueres and J. M. Vincent, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 7764-7765; b) N. Cadelon, D. Lastcoueres, A. K. Diallo, J. R. Aranzaes, D. Astruc and J.-M. Vincent, *Chemical Communications* **2008**, 741-743.
- [37] a) Una relación lineal entre la capacidad donadora de los ligandos (determinada por su afinidad protónica) y la barrera del potencial de activación para la ruptura del enlace metal-carbono se ha encontrado por cálculos DFT de algunos complejos de metales de transición con los mejores dadores disminuyendo la barrera y facilitando la ruptura. H. M. Senn, D.V. Deubel, P. E. Blöchl, A. Togni, G. Frenking, *J. Mol. Struct.* **2000**, *506*, 233-242. La baja capacidad dadora del ligando TBTA podría explicar de esta forma el efecto despreciable de este ligando en las reacciones con diazidas. b) Del mismo modo, la eficiencia de CuTC al catalizar la formación de 1-sulfonil-1,2,3-triazoles sobre otros procesos competitivos en la reacción CuAAC de alquinos con sulfonilazidas se ha atribuido (véase la ref. [33]) a su capacidad para estabilizar el intermedio Cu-triazolil y/o para promover la escisión protonolítica de este intermedio, que también podría explicar su efecto positivo sobre la selectividad de la monofuncionalización del octakis-octaazida-POSS.
- [38] D. D. P. Perrin, D. R. in *Purification of laboratory chemicals*, Vol. Ed. Pergamon Press, **1989**.
- [39] G. Ulrich and R. Ziessel, *Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 2070-2083.
- [40] B. M. Trost and J. Xie, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 6044-6045.
- [41] a) S. D. Burke, K. W. Jung and R. E. Perri, *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 5841-5844; b) S. D. Burke and J. Rancourt, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 2335-2336.
- [42] R. Burai, J. Chatwischen and B. R. McNaughton, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9*, 5056-5058.
- [43] D. James, J.-M. Escudier, E. Amigues, J. Schulz, C. Vitry, T. Bordenave, M. Szlosek-Pinaud and E. Fouquet, *Tetrahedron Letters* **2010**, *51*, 1230-1232.

[44] a) E. Ciganek, *Journal of Organic Chemistry* **1980**, *45*, 1497-1505; b) S. Sarkar, S. Dutta and A. K. Sen, *Synthesis-Stuttgart* **2012**, *44*, 1079-1089.

[45] C. Ferrandiz-Huertas, J. Isac-Garcia, F. Perez-Balderas and F. Santoyo-Gonzalez, *Synthesis-Stuttgart* **2005**, 939-944.

## ***Capítulo 4***

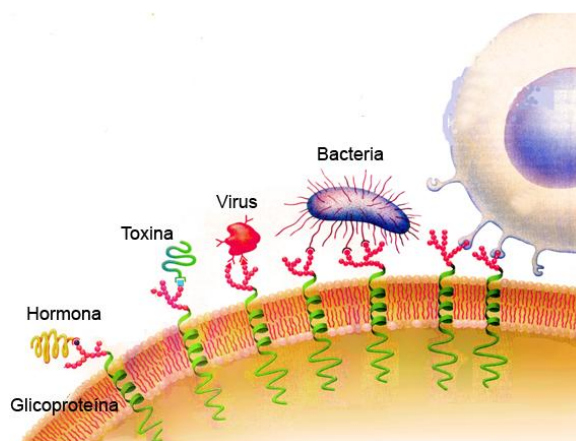
*Síntesis y estudio de Dendrímeros multivalentes  $\alpha$ -D-manosilados de POSS.*



#### 4.1 Introducción

A pesar de que las estructuras de los carbohidratos fueron descritas por Fischer entre 1884 y 1894, ha sido necesario casi un siglo para que la comunidad científica apreciara el papel que estas moléculas desempeñan a nivel biológico ya que introducen una gran complejidad y heterogeneidad indispensables para la vida.<sup>[1]</sup> La variabilidad estructural de los glicanos (diversidad en las posiciones de anclaje: 1→2, 1→3, 1→4 ó 1→6, configuraciones anoméricas:  $\alpha$  ó  $\beta$ , tamaño de anillo: furanosa o piranosa, y las distintas ramificaciones y funcionalizaciones de sus hidroxilos (esterificación, sulfatación, fosforilación, etc) permite la codificación de mucha más información que en el caso de las proteínas y ácidos nucleicos. Es por ello que se ha denominado glicocódigo<sup>[2]</sup> a toda la información que los carbohidratos son capaces de expresar, tal y como una secuencia de ADN codifica información para una función determinada.

La cubierta hidrófila de carbohidratos que recubre la superficie de las células, conocida como glicocálix, sirve como punto de anclaje para otras células, virus, bacterias, toxinas, hormonas y otras moléculas (Figura 4.1)<sup>[3]</sup> y forma la primera línea de interacción con el medio extracelular. Estas moléculas son responsables de las funciones de reconocimiento y adherencia de gran relevancia en múltiples procesos biológicos esenciales, tanto para la función fisiológica normal de los organismos (reconocimiento célula-célula, la regulación del crecimiento y diferenciación celular, la fertilización, la respuesta inmune, la respuesta inflamatoria) como en el desarrollo de numerosas patologías (infecciones microbianas, la metástasis del cáncer).<sup>[4]</sup>



**Figura 4.1** Interacción de los carbohidratos de la superficie celular con diferentes dianas biológicas.

De forma general, estas interacciones están basadas en la unión de los mono- y oligosacáridos a un grupo de proteínas que los reconocen con alta especificidad y que están desprovistas de actividad enzimática y no intervienen en la respuesta inmune: las lectinas.<sup>[3]</sup> El desarrollo de nuevos fármacos basados en pequeñas moléculas que inhiban, regulen o potencien selectivamente estas interacciones para controlar los procesos mencionados es un área de gran actividad investigadora desde hace unos años.

Sin embargo, la unión entre los carbohidratos y sus lectinas complementarias es generalmente débil, con constantes de asociación inferiores a  $10^3 \text{ M}^{-1}$  y con una selectividad y especificidad limitadas. Para poder incrementar la fortaleza de esta asociación se recurre, tanto en la naturaleza como en el laboratorio, a las interacciones múltiples mediante el empleo simultáneo de varias copias del mismo epítopo.<sup>[5]</sup> Éste es el llamado efecto “glicocluster” que es ubicuo en la naturaleza y que fue descrito por primera vez por Lee y colaboradores en 1995 y que ha servido como fuente de inspiración para el diseño de numerosos compuestos multivalentes.<sup>[6]</sup>

En la interacción multivalente, generalmente tanto el ligando sacarídico como el receptor proteico se presentan en forma de múltiples copias. En las células se sitúan las copias de los carbohidratos sobre un armazón molecular glicoproteico o en forma de glicolípidos en la superficie. Las lectinas por su parte, se expresan frecuentemente en forma multimérica o mostrando varios sitios de unión a carbohidrato en la misma unidad proteica. De esta forma, las interacciones entre ambas moléculas se refuerzan dando lugar a una afinidad mucho más alta que la que correspondería al ligando monovalente.<sup>[7]</sup>

Aunque el efecto multivalente estaría *a priori* desfavorecido por el alto coste entrópico que supone la pérdida de grados de libertad en la unión, suele verse compensado entálpicamente. El incremento de afinidad de la unión es debido a diversos mecanismos<sup>[8]</sup> entre los que cabe resaltar tres principalmente (Figura 4.2):

#### 1) Efecto quelato

Se produce en aquellas proteínas o en agregados multiméricos de éstas donde es posible la unión simultánea de más de un ligando de un mismo sistema multivalente. Después de la unión del primer ligando, las uniones intramoleculares de ligandos sucesivos deberían ser más sencillas debido a que los costes entrópicos traslacionales y rotacionales ya han sido cubiertos en la primera unión (Figura 4.2 a). Algunos de los efectos de multivalencia más significativos han sido atribuidos a este efecto, especialmente en la unión de las toxinas

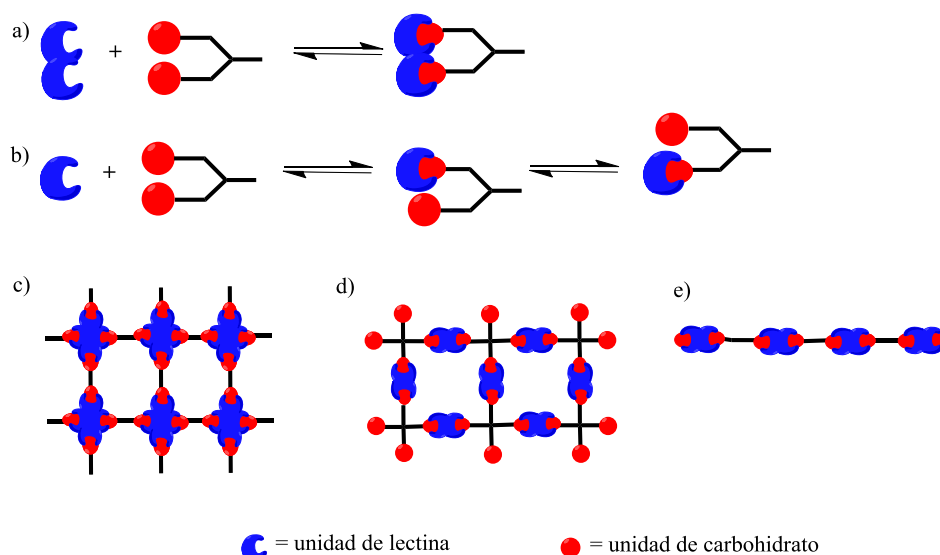
microbianas AB<sub>5</sub> y otras lectinas con más de un lugar de unión, como el receptor trivalente de asialoglicoproteínas de hígado humano descrito por Lee<sup>[7]</sup> o la aglutinina del germen de trigo de naturaleza dimérica (WGA).<sup>[9]</sup>

### 2) Efecto de reasociación estadística (“rebinding”)

En los casos en los que la distancia entre las unidades de carbohidrato en el sistema multivalente es demasiado corta para permitir el efecto quelato o donde la proteína posee un único lugar de unión, los incrementos de afinidad observados se deben fundamentalmente al efecto de reasociación estadística<sup>[10]</sup> (Figura 4.2 b). En este mecanismo, la mejora en la afinidad no se debe tanto a una unión más favorable sino a una ralentización en la disociación del complejo lectina-carbohidrato. La constante cinética de disociación ( $k_{\text{off}}$ ) de un carbohidrato multivalente es mucho más lenta que la de un ligando monovalente ya que, debido a la proximidad entre ligandos, el lugar de unión puede ser ocupado inmediatamente después de que otro lo abandone por uno de los carbohidratos adyacentes, resultando en un incremento neto en la afinidad.<sup>[5, 11]</sup>

### 3) Entrecruzamiento (“cross-linking”)

En las lectinas que tienen dos o más lugares de unión y no es posible la formación de un complejo quelato con el carbohidrato, se forman agregados ordenados con una repetición homogénea lectina-carbohidrato-lectina (Figura 4.2 c-e) y un espaciado regular que le confiere una alta estabilidad termodinámica a este entramado.<sup>[12]</sup> Se sabe que el proceso de entrecruzamiento es el fundamental en la interacción multivalente, pero no está tan claro en qué medida el aumento de la afinidad debido a este proceso se puede diferenciar de la contribución de la reasociación estadística.



**Figura 4.2** Mecanismos del efecto glicoclúster. a) Efecto quelato. b) Efecto de reasociación estadística. c-e) Formación de redes de entrecruzamiento: una lectina tetravalente complejada con un carbohidrato bivalente (c); una lectina bivalente complejada con un carbohidrato tetravalente (d); una lectina bivalente complejada con un ligando bivalente (e).

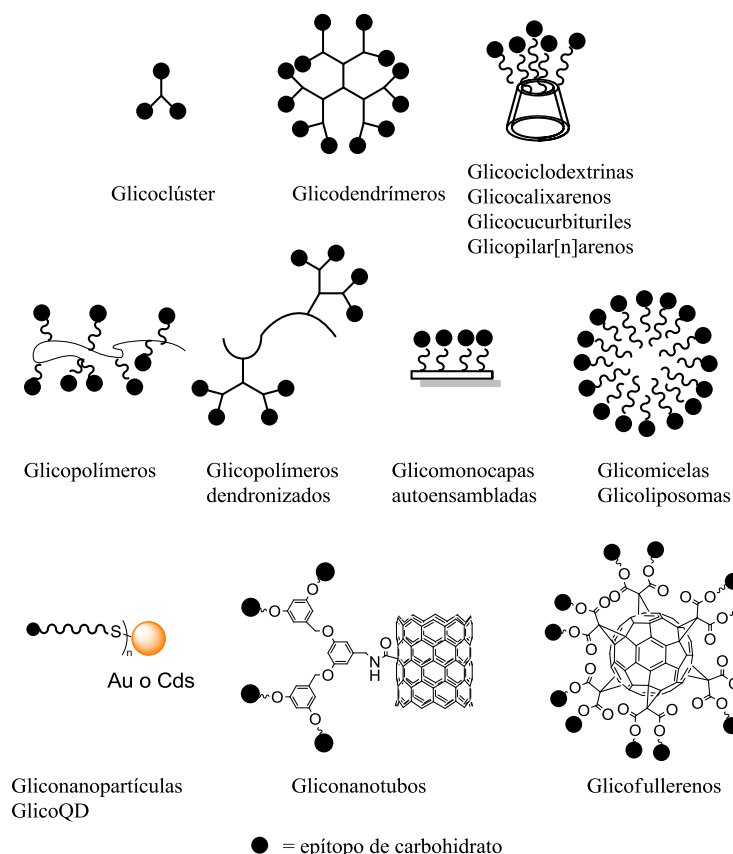
Los efectos no quelato suelen provocar un aumento más pequeño de la afinidad que en aquellos casos donde el mecanismo quelato es operativo, en los que se producen aumentos exponenciales de la afinidad. Sin embargo, cuando los ligandos multivalentes son grandes y contienen muchas (sub)unidades de carbohidratos, los efectos no quelato contribuyen de manera muy importante al aumento de la afinidad. Esto ocurre de forma significativa por ejemplo en el caso de los glicodendrimeros y también, de forma natural, en la unión de las mucinas a lectinas. El mecanismo en este último caso ha sido denominado “mecanismo interno de difusión” (“*bind and slide*”).

Los compuestos sacarídicos sintéticos que ofrecen una presentación multivalente de los carbohidratos reciben generalmente el nombre de neoglicoconjugados multivalentes.<sup>[13]</sup> En la Figura 4.3. se presentan de forma esquemática las estrategias más utilizadas para la síntesis de estos sistemas. En todos los casos, los glicoconjugados naturales se simplifican con diseños más sencillos que suelen incluir una estructura soporte, un epítipo de carbohidrato presentado en múltiples copias que sirve como ligando y un espaciador que une el ligando con el soporte. Los tipos estructurales más comunes empleados hasta el momento podrían clasificarse en cuatro grandes grupos según el soporte empleado: glicoclústeres,<sup>[14]</sup> gliconanopartículas,<sup>[15]</sup> glicopolímeros,<sup>[16]</sup> y glicodendrimeros.<sup>[17]</sup>

Los armazones moleculares más comunes<sup>[18]</sup> están basados en moléculas orgánicas pequeñas de baja valencia como polifenoles y otros armazones aromáticos (porfirinas,<sup>[19]</sup> trifenilenos<sup>[20]</sup> y bencenos hexasustituídos<sup>[21]</sup>) o polialcanoles como los azúcares,<sup>[22]</sup> las ciclodextrinas,<sup>[23]</sup> los ciclotriversaetilenos (CTV)<sup>[24]</sup> y los calixarenos<sup>[25]</sup>, también aromáticos, que presentan además la ventaja de tener una cavidad hidrófoba que podría además utilizarse para la liberación controlada de fármacos. Más recientemente, se han empleado también con este fin los pilar[n]arenos<sup>[26]</sup> y los cucurbiturilos.<sup>[27]</sup>

Existen también numerosos derivados basados en nanopartículas inorgánicas de oro,<sup>[15]</sup> de sílice,<sup>[28]</sup> de CdSe (“*quantum dots*”)<sup>[29]</sup> que presentan propiedades semiconductoras y fluorescentes, o las nanopartículas magnéticas.<sup>[30]</sup> En los últimos años, se han sintetizado glicoclusters basados en distintas formas alotrópicas del carbono como los nanotubos,<sup>[31]</sup> los fullerenos<sup>[32]</sup> y el grafeno.<sup>[33]</sup> Y más recientemente, se han desarrollado también gliconanopartículas proteicas utilizando la cápside de ciertos virus.<sup>[34]</sup> También de naturaleza inorgánica, pero preparados con uniones no covalentes, hay varios ejemplos descritos de complejos metálicos de Pd/Pt,<sup>[35]</sup> Ru<sup>[36]</sup> o Fe<sup>[37]</sup> empleados como armazón central del glicoconjugado. Otros neoglicoconjugados no covalentes son los construidos mediante el autoensamblaje de sistemas anfifílicos en monocapas,<sup>[38]</sup> micelas<sup>[39]</sup> o liposomas.<sup>[40]</sup>

Además, se han sintetizado derivados multivalentes de mayor tamaño y valencia basados en sistemas poliméricos lineales.<sup>[10a, 41]</sup> Estos compuestos suelen ser fáciles de preparar y tienen un coste inferior a los anteriores, pero presentan la desventaja de no ser sistemas monodispersos. Este aspecto queda solventado con la síntesis de glicodendrímeros que, hasta la fecha, parecen ser los armazones más prometedores.<sup>[4d]</sup>



**Figura 4.3** Estructuras más comunes para la formación de neogliconjugados multivalentes.

Los dendrímeros<sup>[42]</sup> son macromoléculas tridimensionales de alta simetría y ramificación con estructura arborescente, generalmente globulares. Se diferencian de los polímeros en que la ramificación está controlada a través de su síntesis dando lugar a moléculas perfectamente definidas, con polidispersidad cercana o igual a 1, lo que hace factible el diseño de macromoléculas con propiedades químicas y físicas específicas para una determinada aplicación.<sup>[43]</sup> Las macromoléculas dendríméricas presentan una forma de crecimiento por capas a las que se denomina generación (G0, G1, G2...). El número de grupos terminales aumenta exponencialmente con el aumento de generaciones y, con ello, la densidad del dendrímero. La accesibilidad de todos los grupos funcionales y la flexibilidad del dendrímero disminuyen en paralelo, por lo que hay que alcanzar un compromiso entre número de generaciones y densidad de grupos terminales, ya que cuando esta última es demasiado alta, la penetración del dendrímero y sus interacciones intermoleculares quedan limitadas.

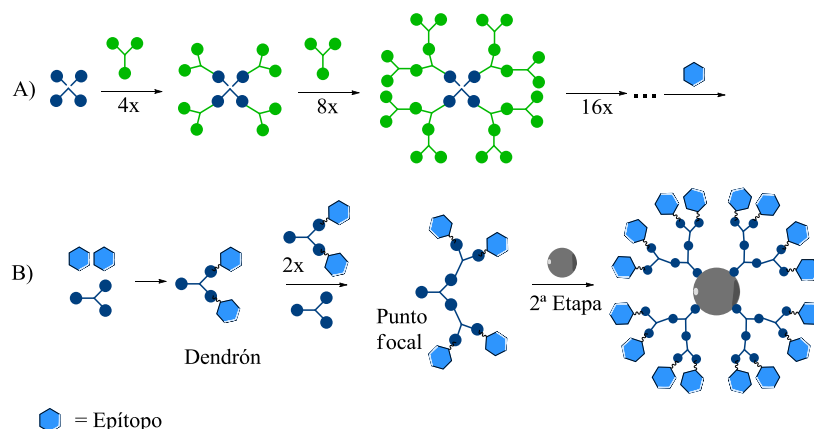
Entre las propiedades más importantes de los dendrímeros, junto con su monodispersidad, se encuentran: a) baja temperatura de transición vítrea; b) baja viscosidad intrínseca; c) alta solubilidad; d) poseen dimensiones nanométricas similares al tamaño de las biomacromoléculas más comunes, tales como proteínas y ácidos nucleicos, lo que facilita su excreción tras ejercer su acción; e) elevada relación de grupos superficiales disponibles para la presentación de epítomos, pero en unas dimensiones que permiten la internalización tisular y celular; f) capacidad de formar sistemas de tipo huésped-anfitrión; g) capacidad para encapsular fármacos de moléculas pequeñas, metales, o sondas en las cavidades interiores.

Las propiedades dendríticas mencionadas anteriormente son consecuencia de su estructura arborescente y de las acciones colectivas de los grupos funcionales. En este sentido se habla de un “comportamiento supramolecular” o “efecto dendrítico”<sup>[44]</sup> que permite también modular su actividad y propiedades biomédicas.

Existen numerosos armazones dendriméricos disponibles comercialmente, entre ellos, los más conocidos son los que contienen grupos amino (PAMAM: poliamidoamina y PPI: propilenimina) y los que contienen grupos hidroxilos (poliglicerol ramificado y Boltorn<sup>®</sup>).<sup>[45]</sup> Sin embargo, para diseños más específicos se acude a la síntesis de dendrímeros que presenten el patrón molecular requerido para su aplicación.

Los primeros ejemplos de glicodendrímeros se describieron en 1993 y estaban basados en L-lisina como unidad de repetición.<sup>[46]</sup> Los glicodendrímeros se pueden sintetizar empleando tanto una estrategia de síntesis *divergente* como *convergente*. En el método divergente,<sup>[42a, 47]</sup> el dendrímero crece hacia afuera desde un centro multifuncional (Figura 4.4, A). Los problemas que presenta esta síntesis son debidos a reacciones incompletas que acaban ocasionando defectos estructurales, de ahí que hayan cobrado gran importancia los métodos de generación de dendrímeros mediante reacciones altamente eficientes como la química “click”<sup>[48]</sup> así como el empleo de la irradiación con microondas<sup>[49]</sup> para mejorar el rendimiento y acortar los tiempos de reacción. En el método convergente<sup>[50]</sup> (Figura 4.4, B), el dendrímero se construye por el acoplamiento de entidades dendriméricas, llamadas dendrones, a un núcleo multifuncional de forma que los dendrones confluyan en un mismo punto denominado focal. Con este método, se disminuyen los defectos estructurales y se facilita la purificación. Además, los glicodendrones son activos por sí mismos y permiten evaluar la actividad de valencias intermedias para optimizarla. El inconveniente de este método es que, debido a impedimentos estéricos, es difícil producir generaciones superiores. Existe una variación de éste último

método, denominada *convergente de doble etapa*, que emplea además un elemento o núcleo central sobre el que se acoplan en una segunda etapa los puntos focales con los dendrones.



**Figura 4.4** Métodos de síntesis de dendrímeros. A) Divergente. B) Convergente y Convergente de doble etapa.

Esta última aproximación permite variar de forma sencilla la simetría del armazón molecular,<sup>[10a, 41]</sup> la longitud, rigidez, patrón fractal y propiedades del espaciador,<sup>[21b, 51]</sup> así como su tamaño y número de epítipos (la valencia),<sup>[52]</sup> parámetros que resultan cruciales para la modulación de la afinidad. Por este motivo, los dendrímeros sintetizados y estudiados en este capítulo se prepararon por el método convergente de doble etapa.

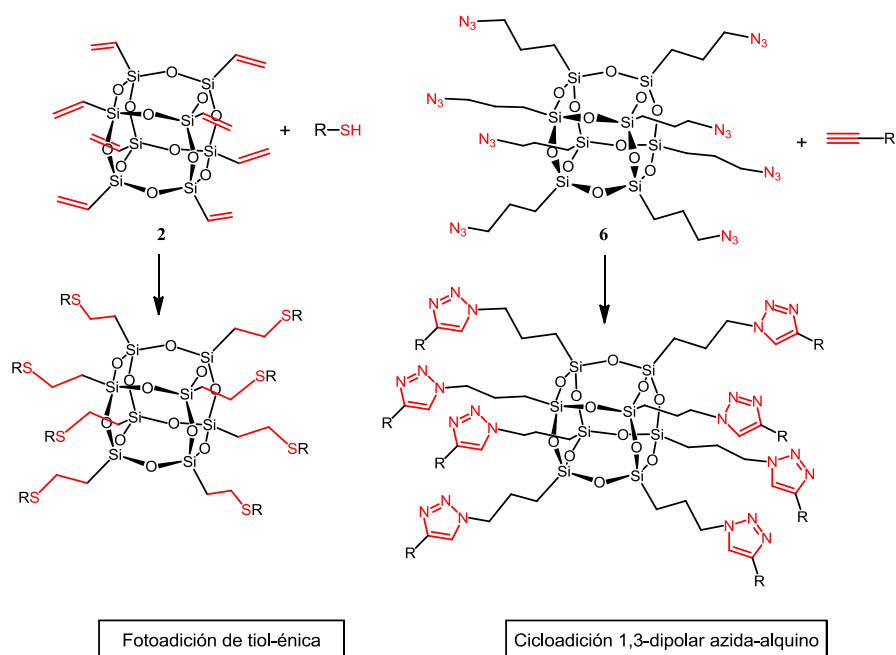
Los dendrímeros basados en silicio se han empleado especialmente en la síntesis de compuestos biológicamente activos.<sup>[53]</sup> Las estructuras más empleadas han sido los carbosilanos<sup>[54]</sup> y los carbosiloxanos<sup>[55]</sup> preparados por hidrosililación catalizada por paladio de alquenos/alquinos o de aldehídos/cetonas respectivamente. Otros entramados muy utilizados para la preparación de silicodendrímeros son los silsesquioxanos que, como se dijo en capítulos anteriores, son de naturaleza intermedia entre la sílica inorgánica ( $\text{SiO}_2$ ) y las siliconas ( $\text{R}_2\text{SiO}$ )<sub>n</sub>, lo que les confiere unas propiedades muy interesantes. De entre ellos, los que forman jaulas poliédricas (POSS) se están empleando mucho para aplicaciones biomédicas incluyendo la liberación de fármacos,<sup>[56]</sup> biosensores,<sup>[57]</sup> biodispositivos e ingeniería de tejidos.<sup>[58]</sup> Además, dado que permiten controlar la geometría y el grado de sustitución, se han utilizado para la presentación multivalente de carbohidratos.<sup>[59]</sup>

En 1998, el grupo de Feher y colaboradores describió los primeros ejemplos de POSS glico-funcionalizados<sup>[59a, b]</sup> preparados por reacción de acilación del octaquis(aminopropil)-POSS con lactonas derivadas de carbohidratos. Sin embargo, los rendimientos de esta reacción



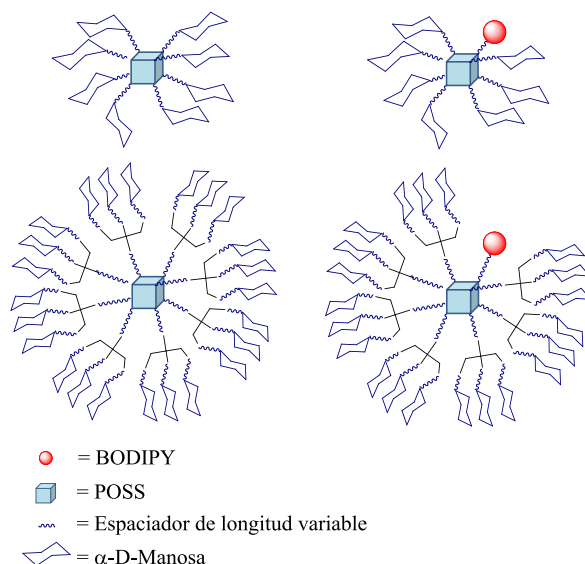
fueron solo moderados (20-60%) por lo que fue necesario desarrollar una aproximación más eficiente. Hasta la fecha, se han descrito dos aproximaciones de este tipo para la síntesis de glico-POSS (Figura 4.5) empleando la fotoadición de tioles a alquenos y la cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizada por Cu(I) (CuAAC). Así, el grupo de Lee y colaboradores describió en 2004 la síntesis de glico-POSS de  $\alpha$ -D-manosa,  $\beta$ -D-galactosa y lactosa vía fotoadición de azúcares con espaciadores de diferente longitud con un grupo tiol terminal a octaviniloctasilsesquioxano (OVS, compuesto **2**) y estudiaron además su actividad frente a la lectina RC120 que reconoce específicamente  $\beta$ -D-galactósidos.<sup>[59c]</sup> En 2010, nuestro grupo de investigación describió la síntesis del octakis(3-azidopropil)octasilsesquioxano y de sus derivados octasustituídos mediante reacción CuAAC, incluyendo clústeres de  $\alpha$ -D-manosa.<sup>[59e]</sup> Este estudio fue ampliado posteriormente empleando también diferentes espaciadores y tipos de unión del carbohidrato (O- y C-glicósido) y estudiando su interacción con la lectina modelo concanavalina A empleando varias técnicas biofísicas.<sup>[59h]</sup> Casi de forma simultánea, aparecieron otros dos ejemplos más en la bibliografía que empleaban una metodología similar.<sup>[59d, 59f]</sup> Más recientemente, el grupo de Dondoni ha empleado de nuevo a la fotoadición de tioles a alquenos para sintetizar una serie de glico-POSS tratando así de evitar el empleo de cobre en la síntesis.<sup>[59g, 59i, j]</sup>

Los ejemplos anteriores muestran que los POSS de geometría cúbica son buenos núcleos estructurales para la construcción de sistemas multivalentes de carbohidratos, siendo además biocompatibles y fácilmente excretables dada su capacidad de hidrolizarse lentamente en condiciones fisiológicas. Además, por su estructura rígida y altamente simétrica, el POSS puede dotar al glicoclúster de una mayor afinidad de unión a la lectina al reducir la barrera entrópica de complejación.<sup>[60]</sup>



**Figura 4.5** Estrategias “click” para la síntesis de glico-POSS.

En este capítulo se describirá la síntesis de dendrímeros funcionalizados con unidades de  $\alpha$ -D-manosa (de 7, 8, 21 ó 24 unidades) con núcleo cúbico de POSS T<sub>8</sub>. Se han preparado derivados completamente simétricos con 8 o 24 unidades sacarídicas y con espaciadores de distinta longitud. De forma paralela, utilizando la metodología descrita en el capítulo anterior para la monofuncionalización selectiva de POSS, se prepararon los derivados correspondientes marcados con una sonda fluorescente de la familia de los BODIPYs en uno de los vértices del cubo de POSS para poder estudiar la interacción con las lectinas complementarias mediante técnicas biofísicas y de microscopía (Figura 4.6).



**Figura 4.6** Representación esquemática de los diferentes glico-POSS de  $\alpha$ -D-manosa sintetizados.

Existe una gran variedad de proteínas que pueden unir específicamente residuos de  $\alpha$ -D-manosa,<sup>[45b, 61]</sup> entre ellas muchas lectinas de plantas, como la concanavalina A (Con A), que han sido las más estudiadas desde el punto de vista cristalográfico y de la interacción multivalente. Además de éstas, por su interés biomédico se han estudiado también en profundidad las siguientes lectinas humanas: la MBP (mannose binding protein) y la DC-SIGN de las células dendríticas, ambas implicadas en el reconocimiento de microorganismos por parte de las células del sistema inmune. También, por el interés que despierta para la profilaxis y tratamiento de ciertas enfermedades, se han investigado las lectinas bacterianas adhesinas FimH tipo 1 presentes en las fimbrias de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens* y *Shigella flexneri*.<sup>[62]</sup>

En este capítulo, se ha estudiado la interacción multivalente de los glicodendrímeros de POSS sintetizados frente a la lectina modelo Con A empleando distintas técnicas biofísicas: resonancia de plasmón de superficie (SPR), calorimetría de valoración isotérmica (ITC) y polarización/anisotropía de fluorescencia (AF). Además, se ha estudiado mediante microscopía confocal la interacción de un glico-POSS marcado fluorescentemente con células dendríticas humanas K562-CD209.<sup>[63]</sup> Estas células expresan un alto número de receptores DC-SIGN en la membrana celular lo que nos ha permitido estudiar la unión específica de los glicodendrímeros de manosa a la membrana celular mediante microscopía confocal.

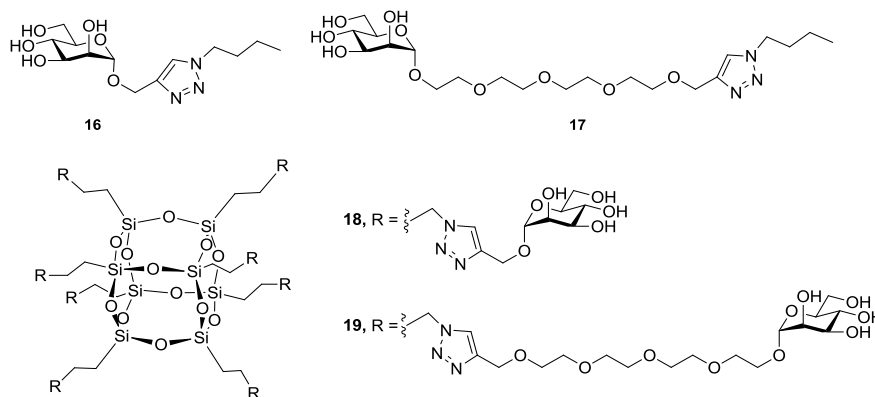
## 4.2 Resultados y discusión

### 4.2.1 Síntesis y estudio de glicodendrimeros con simetría cúbica

#### A Síntesis de dendrimeros de $\alpha$ -D-manosa con núcleo de POSS T<sub>8</sub>

Con anterioridad, en nuestro grupo de investigación se sintetizaron distintos glicoclusters octasustituídos basados en POSS<sup>[59h]</sup> mediante reacción CuAAC y se evaluó su interacción con la lectina modelo Con A (compuestos **18** y **19**, Figura 4.7). Se prepararon además los correspondientes análogos sin núcleo de POSS (compuestos **16** y **17**, Figura 4.7) como modelos monovalentes para los estudios de interacción con la lectina en comparación con el  $\alpha$ -D-manopiranosido de metilo.<sup>[10d]</sup>

La interacción de los glico-POSS **18** y **19** con la lectina Con A se estudió mediante SPR, ITC y cristalografía de rayos X, demostrando que se produce un efecto glicoclúster y que las constantes de afinidad mejoraban unas 30 veces con respecto a las descritas por otros autores para el  $\alpha$ -manopiranosido de metilo<sup>[10d]</sup> cuando la lectina está soportada en una superficie (SPR) y hasta 170 veces cuando se encontraba libre en disolución (ITC). El efecto multivalente observado para estos compuestos se debe al fenómeno de reasociación estadística y al entrecruzamiento lectina/glico-POSS observado solo en disolución, ya que las dimensiones del compuesto no son adecuadas para poder complejar simultáneamente dos sitios de unión de la lectina como requiere el efecto quelato. La longitud del conector entre el carbohidrato y el núcleo de POSS ha demostrado tener poca influencia sobre el efecto de reasociación, pero no así sobre el de entrecruzamiento que si se ve muy afectado. El glico-POSS **19**, con conector de mayor longitud, se comporta como un ligando octavalente frente a Con A en disolución, mientras que los glico-POSS con conectores más cortos actúan solo como tetravalentes, a pesar de disponer de ocho unidades de D-manosa en su estructura. En todos los casos, el tetrámero de la lectina tiene sus cuatro sitios de unión ocupados por unidades de D-manosa de cuatro moléculas diferentes de glico-POSS.

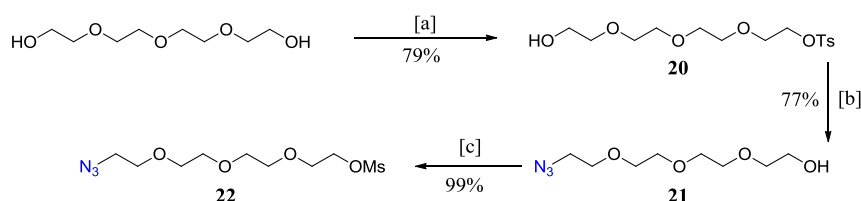


**Figura 4.7** Glico-POSS estudiados anteriormente en nuestro grupo de investigación.

Este trabajo incluía además un estudio de la hidrólisis de los glico-POSS desprotegidos en medio acuoso y se observó que estos compuestos son lábiles a  $\text{pH} > 6$ , con una vida media de unas 12 horas en condiciones fisiológicas ( $\text{pH} = 7.4$ ). La baja toxicidad que generalmente presentan los organosilanos convierte a los silsesquioxanos en unos compuestos muy apropiados para aplicaciones *in vivo* ya que la reducción del tamaño molecular debida a la hidrólisis del núcleo de POSS debe facilitar su excreción.

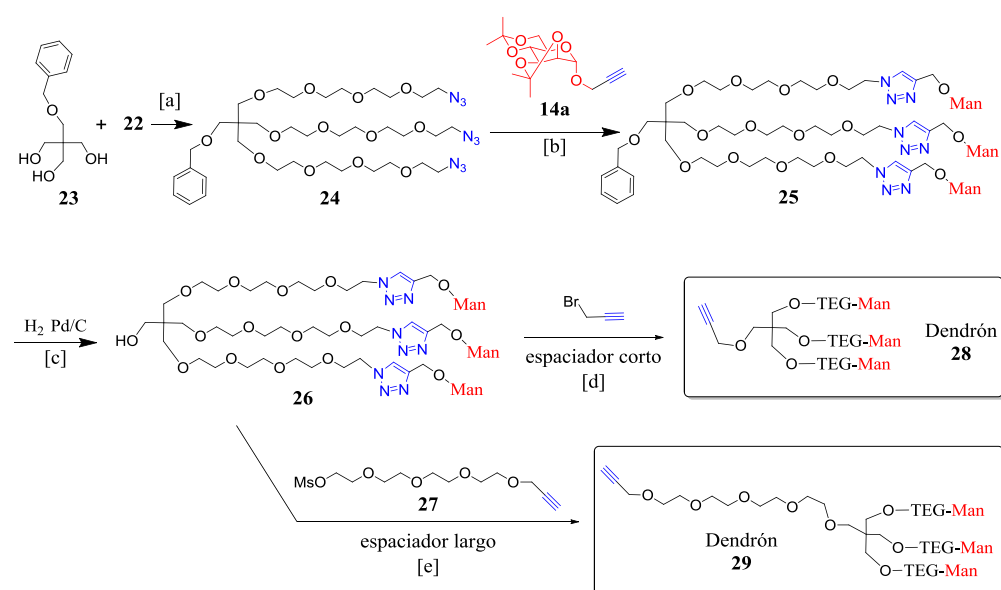
Con estos antecedentes, se decidió preparar nuevos sistemas multivalentes basados en POSS incrementando el número de epítopos sacarídicos para aumentar así la afinidad y optimizar la valencia para su interacción con lectinas. Se diseñaron así glico-POSS con estructuras dendríméricas basadas en una ramificación de tipo  $\text{AB}_3$ <sup>[64]</sup> en cada uno de los vértices del cubo de silsesquioxano. Para ello se utilizó la molécula de pentaeritritol, ampliamente usada en la bibliografía para la síntesis de dendrímeros. Este compuesto presenta cuatro grupos hidroxilo simétricamente dispuestos en posiciones tetraédricas y es un excelente bloque de construcción para preparar estructuras altamente ramificadas. En 1998, se describieron los primeros dendrímeros manosilados basados en pentaeritritol y desde entonces hay numerosos ejemplos en la bibliografía que lo emplean como elemento de ramificación.<sup>[65]</sup>

En esta tesis, se han preparado glicodendrímeros con núcleo de POSS empleando unidades de pentaeritritol como elementos de ramificación y cadenas de tetraetilenglicol como espaciadores dada su biocompatibilidad y carácter no inmunogénico.<sup>[66]</sup> La ruta sintética seguida para la preparación de este conector se detalla a continuación (Esquema 4.1). El compuesto **22** se preparó por reacción del tetraetilenglicol monotosilado (**20**)<sup>[67]</sup> con azida sódica empleando un procedimiento descrito,<sup>[68]</sup> seguido de mesilación con cloruro de mesilo y trietilamina.<sup>[69]</sup>



**Esquema 4.1** Síntesis del espaciador **22**. Condiciones y reactivos: [a] TsCl, NaOH, THF, 0 °C, 2.5 h. [b] NaN<sub>3</sub>, MeCN, 100 °C, 18 h, [c] MsCl, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a., 1.2 h.

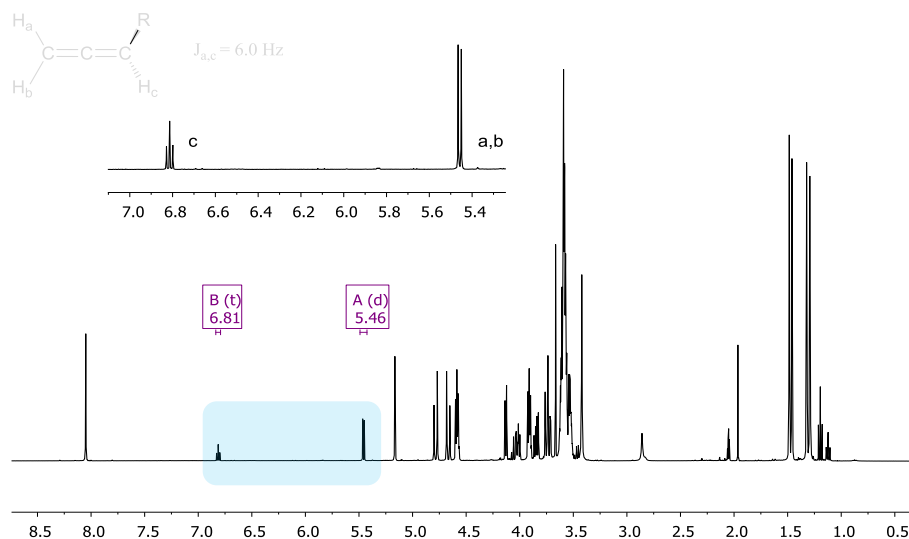
La síntesis de los dendrones que serán acoplados posteriormente al octaquis-(3-azidopropil)octasilsesquioxano **6** (Figura 4.6) se llevó a cabo a partir del pentaeritritol monobencilado **23**<sup>[70]</sup> (Esquema 4.2).



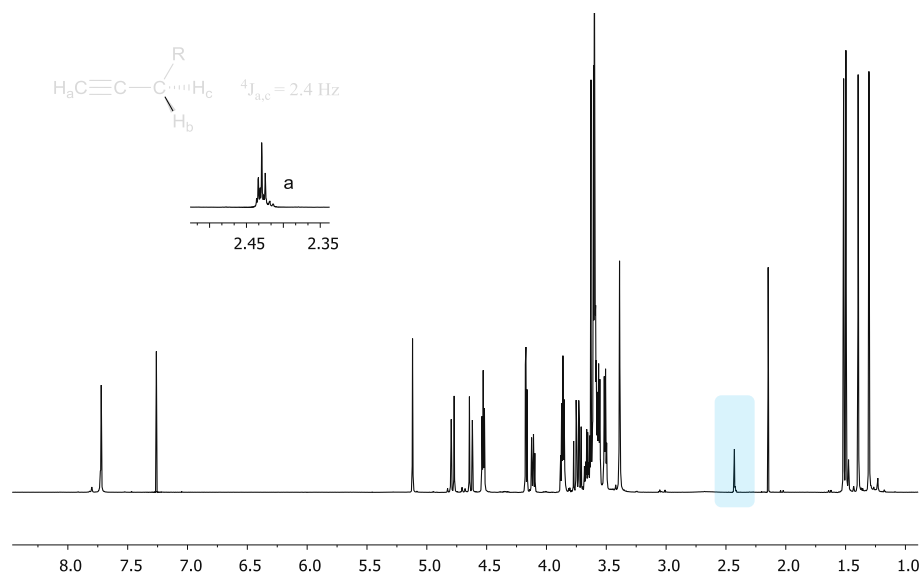
**Esquema 4.2** Ruta de síntesis para la preparación de dendrones manosilados. \*TEG = tetraetilenglicol, Man =  $\alpha$ -D-manopiranososa protegida con isopropilidén acetales. [a] NaH, DMF, 60 °C, 13 h, (52%). [b] CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, ascorbato sódico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O 1:1, t.a., 12 h, (78%). [c] H<sub>2</sub>, Pd/C, 1 atm, AcOEt, t.a., 12 h, (100%). [d] Bromuro de propargilo 80% en tolueno, NaH, DMF, t.a. 48 h, (92%). [e] NaH, THF, 50 °C, 36 h, (68%).

La alquilación de **23** con el mesilato **22** en presencia de NaH para dar **24** tuvo lugar con rendimiento moderado (52%). Esta reacción se llevó a cabo a temperatura moderada para evitar reacciones secundarias de eliminación del grupo mesilato. El acoplamiento del pentaeritritol **24** con el  $\alpha$ -D-manopiranosido de propargilo **14**, descrito en el capítulo anterior, se realizó mediante una reacción CuAAC en condiciones de Sharpless modificadas<sup>[71]</sup> (CuSO<sub>4</sub>,

ascorbato sódico,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$  1:1) para dar el glico-dendrón **25** con buen rendimiento (78%). La hidrogenolisis de **25** en condiciones estándar rindió el producto desbencilado **26** de forma cuantitativa. La O-alkilación de **26** con bromuro de propargilo para dar el glico-dendrón **28** con un rendimiento excelente (92%) se llevó a cabo en condiciones suaves. Sin embargo, la O-alkilación de **26** con el alquínil-derivado **27** resultó problemática debido al impedimento estérico del grupo hidroxilo que reduce la reactividad del alcóxido frente a la sustitución nucleófila. Así, en los primeros ensayos de alquilación en DMF como disolvente (12 h a 65 °C) se produjo la isomerización del propargil éter al alenil éter correspondiente de forma irreversible, reacción favorecida por la alta constante dieléctrica de la DMF.<sup>[72]</sup> Esta isomerización se detectó por  $^1\text{H}$  RMN ya que aparecían las señales características de los alenos monosustituídos en el intervalo 5.5 – 7.0 ppm (Figura 4.8). La reacción de alquilación de **26** con el mesilato **27** se pudo finalmente llevar a cabo de forma satisfactoria para dar **29** con un 68% de rendimiento sustituyendo la DMF por THF, menos polar, a temperatura moderada (50 °C) como se muestra en el esquema 4.2. (Figura 4.9).



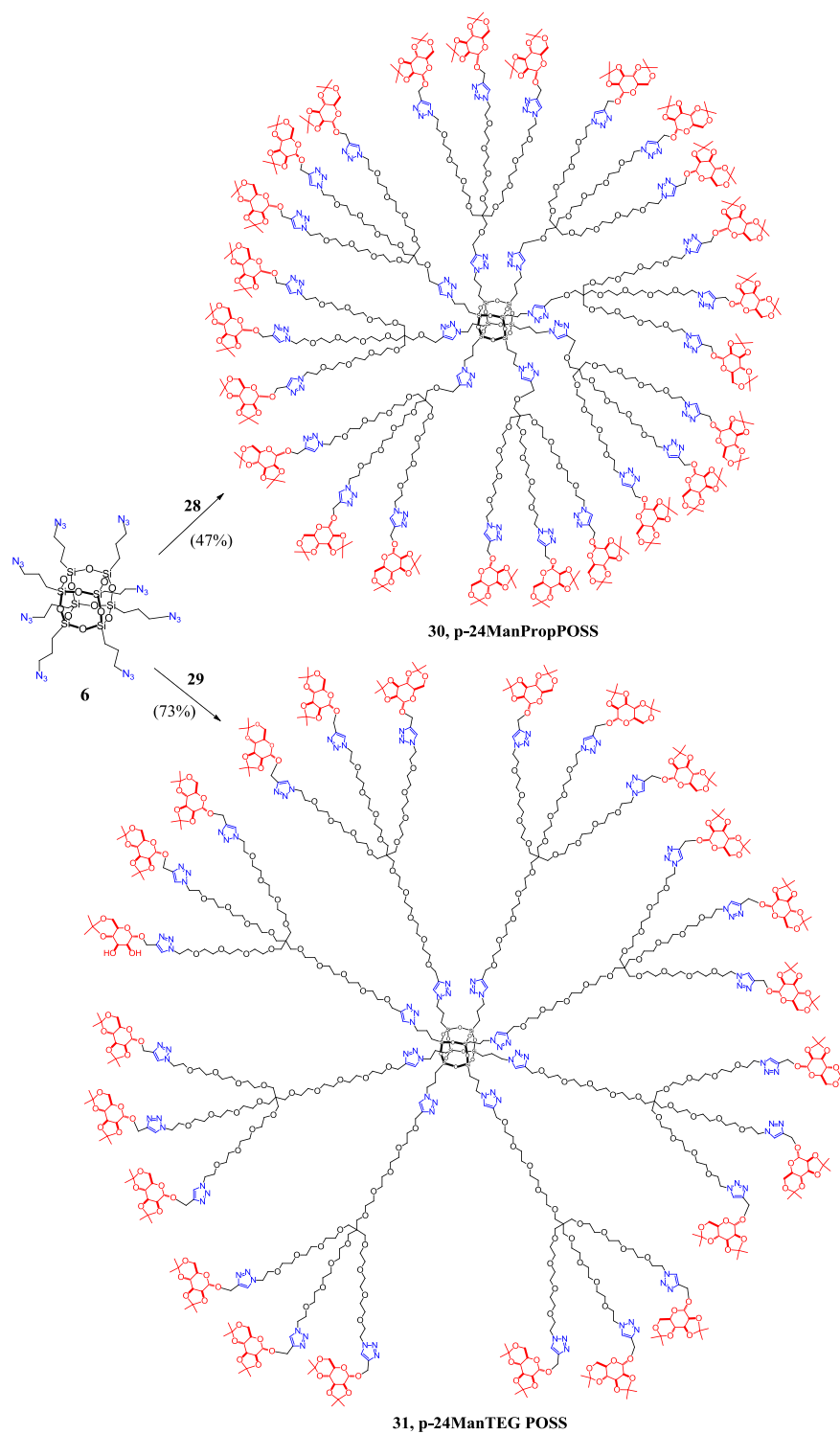
**Figura 4.8**  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) del crudo de la reacción de **26** con **27** en DMF mostrando la isomerización del alquino a aleno.



**Figura 4.9**  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del glicodendrón **29** sintetizado empleando THF como disolvente.

Se obtuvieron dos dendrones (**28** y **29**) con diferente distancia de los epítomos sacarídicos al punto focal. Se procedió a continuación al acoplamiento de éstos con el núcleo de POSS mediante reacción CuAAC. Sin embargo, en este caso la reacción se llevó a cabo en medio orgánico (tolueno) empleando el catalizador **Cu-tren** descrito en el capítulo anterior<sup>[73]</sup> para evitar así un contacto prolongado del POSS con el medio acuoso requerido en las condiciones de Sharpless. Este método permite además la irradiación con microondas para acelerar las reacciones dado el alto impedimento estérico que experimentarán los dendrones conforme el grado de sustitución del POSS vaya aumentando. Las condiciones para la reacción click son similares a las descritas en el método E del capítulo anterior, pero en este caso la estequiometría de la reacción cambia ya que se pretende la funcionalización completa y homogénea de la estructura de silsesquioxano (Esquema 4.3). La reacción CuAAC para la síntesis de los dendrímeros (**30** y **31**) se realizó con una relación estequiométrica 10:1 dendrón (**28** ó **29**)/POSS **6** que supone un exceso de 0.25 equivalentes de alquino por grupo azida. Además, se emplearon 0.5 equivalentes de Cu-tren por equivalente de POSS (0.06 eq. por grupo azida) y 20 equivalentes de base  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (2 equivalentes por grupo alquino). Las reacciones se llevaron a cabo en tolueno en un tubo cerrado bajo irradiación con microondas focalizadas a 80 °C y en atmósfera inerte.

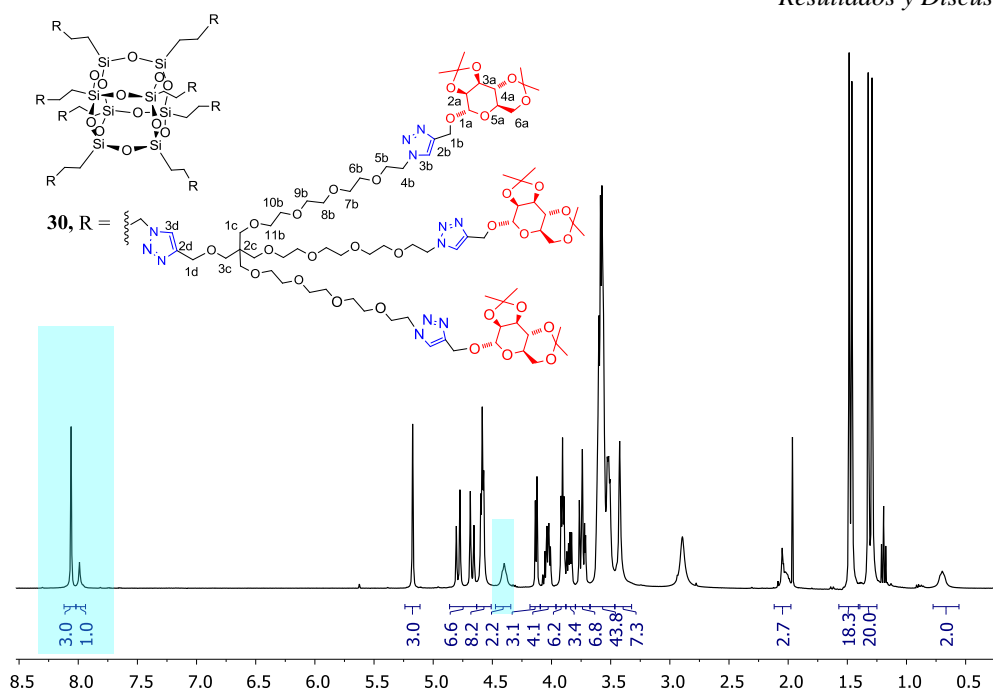




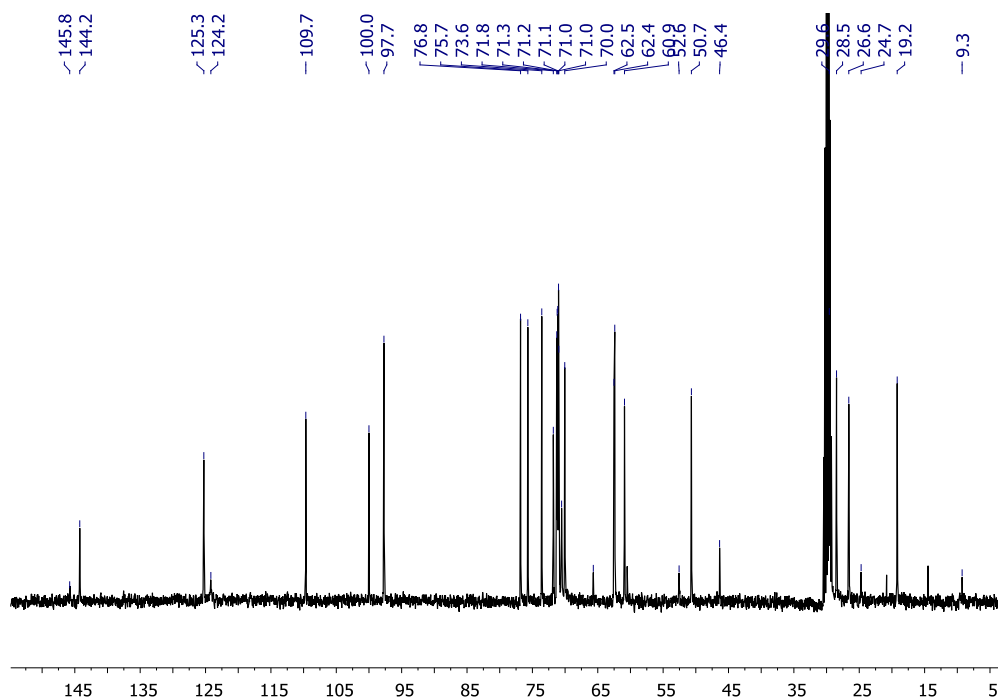
**Esquema 4.3** Dendrímeros manosilados sintetizados mediante reacción CuAAC.

Dada la alta polaridad de los dendrímeros sintetizados que contienen 32 grupos 1,2,3-triazol, la purificación de estos compuestos no pudo realizarse por cromatografía flash en columna de gel de sílice. Los crudos de reacción se purificaron mediante cromatografía de exclusión de tamaños utilizando Sephadex®-LH20 como fase estacionaria. Los compuestos fueron caracterizados inequívocamente por espectroscopia de RMN multinuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ) y espectroscopía IR, así como por espectrometría de masas MALDI-TOF (ver parte experimental).

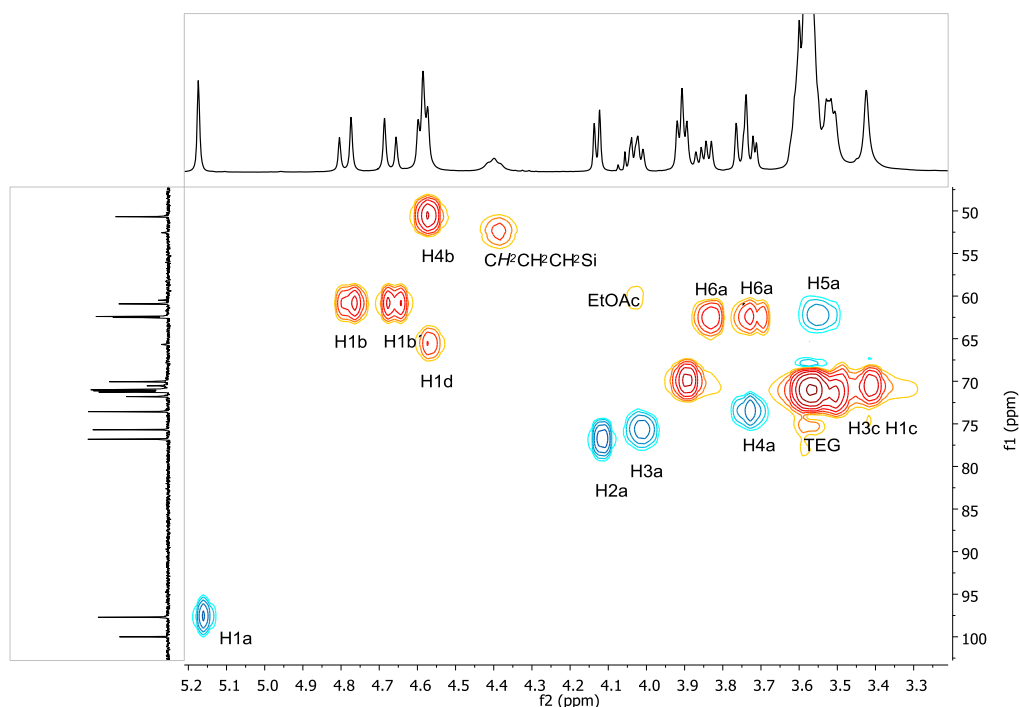
La funcionalización completa y homogénea del núcleo de POSS de **6** se confirmó por la desaparición de la señal del triplete a 3.27 ppm, que corresponde al grupo  $\text{CH}_2\text{-N}_3$  en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN, y la aparición de un nuevo triplete a 4.40 ppm (t,  $J = 5.8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ) que integraba para los 16 protones correspondientes, corroborando la octasustitución. Además, se observó una relación 3:1 entre la integral de la señal de los protones de los triazoles procedentes del dendrón y del protón del nuevo triazol formado en el acoplamiento al POSS **6** (8.06 ppm, s, 3H y 7.99 ppm, s, 1H) (Figura 4.10). Los experimentos bidimensionales de heterocorrelación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC y HMBC, facilitaron la asignación inequívoca de los protones y carbonos del carbohidrato y confirmaron nuevamente la octasustitución perfecta (Figura 4.12).



**Figura 4.10** Estructura y espectro  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz, acetona- $d_6$ ) del dendrímero **30** (24p-ManPropPOSS). Aparecen marcadas las zonas de las señales del CH del 1,2,3-triazol con relación de integrales 3:1 y del  $\text{CH}_2$  unido a triazol resultado de la reacción click.

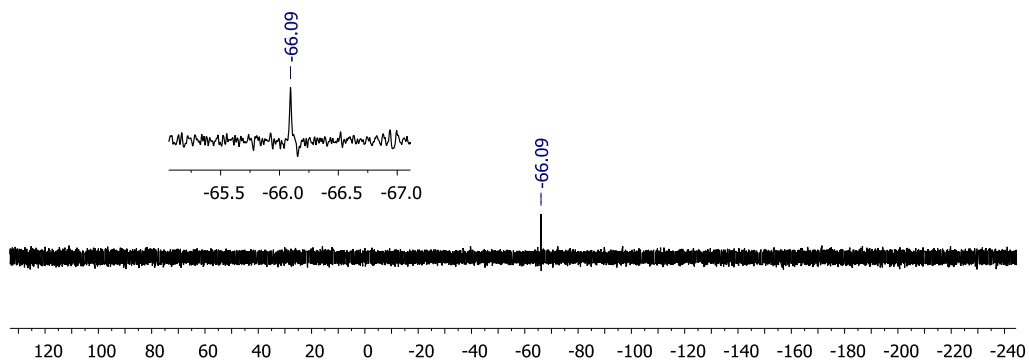


**Figura 4.11** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz, acetona- $d_6$ ) del dendrímero **30** (24p-ManPropPOSS).



**Figura 4.12** Espectro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (acetona- $\text{d}_6$ ) del dendrímero **30** (24p-ManPropPOSS).

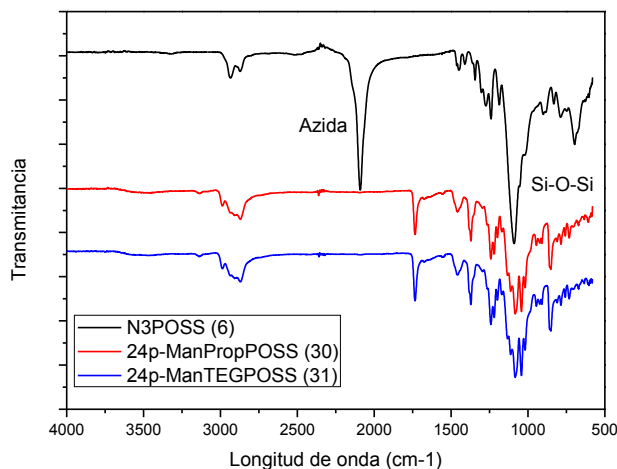
El desplazamiento químico de  $^{29}\text{Si}$  de ambos compuestos se encontraba dentro de la región esperada para un POSS cúbico sustituido con grupos alquílicos (–65 a –70 ppm) y confirmó que la estructura de silsesquioxano no había sufrido ninguna alteración (Figura 4.13).



**Figura 4.13**  $^{29}\text{Si}$  RMN (79.5 MHz, acetona- $\text{d}_6$ ) del compuesto **30** (24p-ManPropPOSS).

El espectro FT-IR mostró la total desaparición de la banda de azida ( $2090\text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 4.14) y la presencia de una banda muy intensa a  $1085\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la

vibración de tensión asimétrica  $\nu_{\text{st}}$  de la agrupación Si-O-Si característica de los poliedros de silsesquioxano.

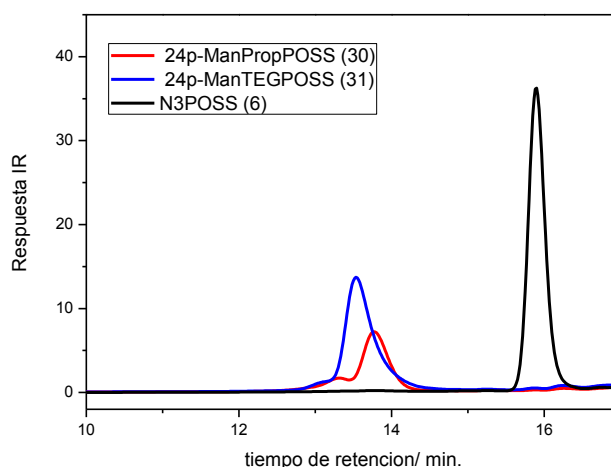


**Figura 4.14** Espectro FT-IR de los dendrímeros **30** y **31** comparados con el del azido-POSS **6** de partida.

Hemos decidido presentar sólo los datos del dendrímero **30** para mostrar el grado de pureza de los productos obtenidos, dado que al ser éste el compuesto más impedido estéricamente es el que podría haber dado lugar a funcionalizaciones incompletas que quedan así descartadas, como confirman los espectros FT-IR. Los espectros correspondientes al dendrímero **31** aparecen recogidos en el Anexo. Son muy similares a los de **30** a excepción del multiplete que aparece en torno a 3.5 ppm correspondiente a los CH<sub>2</sub> de las cadenas de oligoetilenglicol que es más intenso en el caso de **31** dada la mayor proporción de conector en el dendrímero final.

Se realizó también un estudio del tamaño relativo de los dendrímeros preparados con respecto al POSS de partida basándonos en las diferencias en el tiempo de retención en cromatografía de permeación en gel (GPC). El análisis GPC, empleando THF como eluyente y un detector de índice de refracción, demostró que los dendrímeros tienen un menor tiempo de elución que el del POSS de partida **6** y, por tanto, un tamaño muy superior (Figura 4.15). Se aprecia también una pequeña diferencia entre los dendrímeros con diferente longitud de espaciador quedando menos retenido (mayor tamaño) **31** con conector más largo, aunque las diferencias no son muy acusadas. Dado que el calibrado de pesos moleculares para GPC se efectuó con patrones lineales de poliestireno, los valores estimados para los dendrímeros, con geometría aproximadamente esférica, son inferiores a los calculados a partir de su fórmula

molecular (Tabla 4.1). La forma y pequeña anchura de las curvas verifican también que se trata de muestras monodispersas tal y como confirma el bajo valor del índice de polidispersidad determinado.



**Figura 4.15** Cromatogramas de GPC de los POSS **6**, **30** y **31** empleando THF como eluyente y columna PL-Gel (300\*7.8 mm, 5  $\mu$ m de tamaño nominal de partícula) de Polymer Lab

**Tabla 4.1** Parámetros obtenidos en el GPC para los dendrímeros protegidos.<sup>[a]</sup>

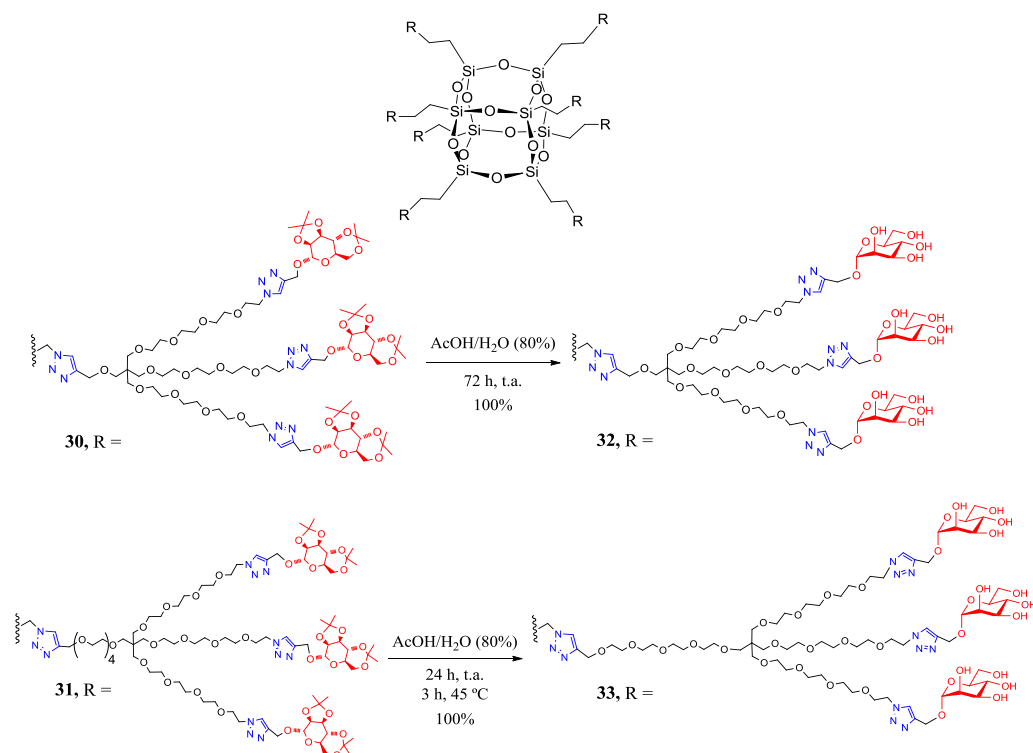
Compuesto	$t_{\text{retención}}$ (min)	$M_w$ teórico	$M_n$	$M_w$	$M_z$	IPD $M_w/M_n$
N <sub>3</sub> POSS <b>6</b>	15.894	1089.4755	978	994	1009	1.016
24pManPropPOSS <b>30</b>	13.772	14472.3403	11005	11290	11566	1.025
24pManTEGPOSS <b>31</b>	13.535	15841.9584	13522	14688	15908	1.086

<sup>[a]</sup>  $M_n = \sum N_i M_i / \sum N_i$  = peso molecular promedio en número;  $M_w = \sum N_i M_i^2 / \sum N_i M_i$  = peso molecular promedio en peso;  $M_z = \sum N_i M_i^3 / \sum N_i M_i^2$  = peso molecular en tercer promedio; siendo  $N$  el número de moléculas de la especie  $i$  y  $M$  la masa de cada una de ellas. IPD = índice de polidispersidad.

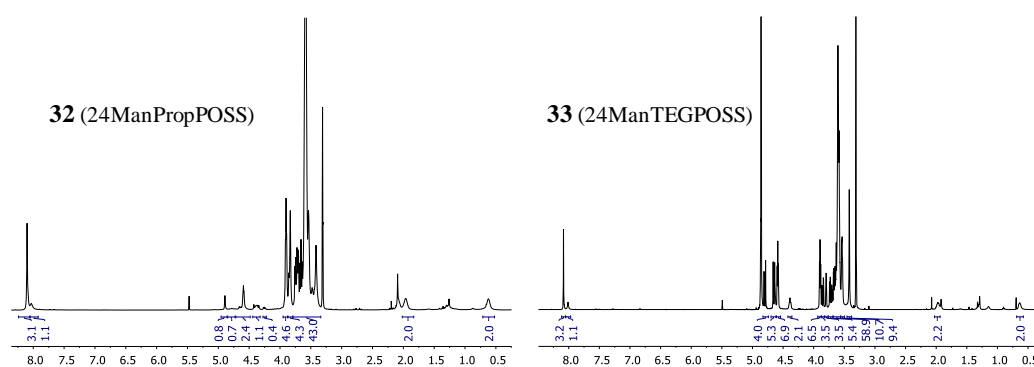
Una vez comprobada la homogeneidad de los sistemas dendríticos sintetizados se procedió a su desprotección en condiciones ácidas suaves y al estudio de la interacción de los derivados desprotegidos resultantes frente a lectinas empleando diferentes técnicas biofísicas. Aunque los grupos isopropilidén acetal se desprotegen fácilmente en medio ácido suave (AcOH acuoso al 80%), y la desprotección de los glico-POSS octavalentes de  $\alpha$ -D-manosa previamente sintetizados en el grupo<sup>[59h]</sup> se había efectuado en estas condiciones sin problemas, la desprotección completa de los sistemas de tipo dendrímero con 24 unidades de carbohidrato

(48 grupos acetal) fue más problemática. Esto se debe probablemente a que en el medio polar de reacción, necesario para poder solubilizar el producto final, los grupos protectores de naturaleza apolar quedan ocluidos u orientados hacia el interior del dendrímero donde se encuentran las cadenas de etilenglicol y propilo, disminuyendo su accesibilidad y dificultando su desprotección (o bien se forman agregados intermoleculares, con la misma consecuencia). Se ensayaron otros métodos de desprotección empleando TFA en mezclas THF:H<sub>2</sub>O 4:1<sup>[59h]</sup> o generando HCl *in situ* a partir de cloruro de acetilo y MeOH<sup>[74]</sup> con peores resultados, dando lugar a muestras impurificadas o rupturas parciales de la estructura de silsesquioxano. Finalmente, el tratamiento con AcOH acuoso al 80% durante 1-3 horas, a temperatura moderada (35-45 °C) para evitar la posible descomposición de la estructura de POSS, rindió los productos completamente desprotegidos con buenos rendimientos. El espectro de <sup>1</sup>H RMN mostró la ausencia de los cuatro singletes correspondientes a los grupos metilo de los grupos isopropilidén acetal junto con un desplazamiento de las señales de los protones del anillo de manosa hacia campo alto. En todos los casos, se observó primero la desaparición mayoritaria de los metilos correspondientes a los grupos protectores de los hidroxilos en C-4 y C-6 del azúcar por su esperada mayor reactividad. Finalmente, los productos finales se aislaron con alta pureza tras dilución con agua y doble liofilización para eliminar trazas de ácido, sin requerir purificación adicional (Esquema 4.4).

Los dendrímeros **32** (24ManPropPOSS) y **33** (24ManTEGPOSS) se caracterizaron por espectroscopía de RMN multinuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>29</sup>Si) en CD<sub>3</sub>OD (ver parte experimental y Anexo). Los espectros obtenidos (Figura 4.16) confirman la desaparición completa de los grupos protectores y la correcta simetría cúbica de la caja. En el caso del dendrímero con espaciador largo **33**, se aprecia una señal a 4.87 ppm que corresponde al elevado porcentaje de agua ocluida, ya que se trata de una muestra altamente higroscópica debido a las numerosas cadenas de tetraetilenglicol.



**Esquema 4.4** Deprotección final de los glico-POSS dendríméricos en condiciones ácidas suaves.



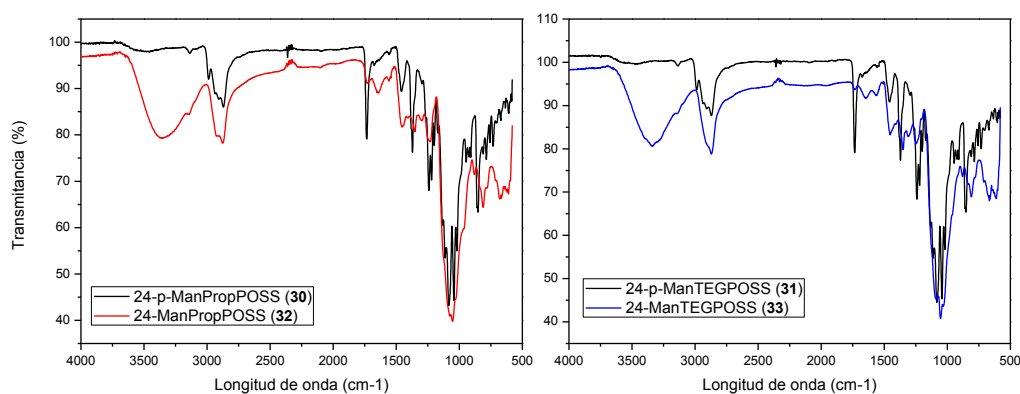
**Figura 4.16** Espectros <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) de los dendrímicos **32** y **33**.

El análisis MALDI-TOFF no dio los resultados esperados, si bien los espectros coinciden en el rango de masas calculado, no se observaron picos estrechos y bien definidos sino bandas anchas con poca resolución. Se ensayaron distintas matrices, adición de sales de plata y diferentes potencias del láser de ionización, pero no se consiguieron mejores resultados.



Este fenómeno se ha descrito con anterioridad en revisiones detalladas sobre la purificación y caracterización de dendrímeros.<sup>[66]</sup> Los grupos de J. Rojo y N. Martín comentan un problema parecido en glicodendrimeros basados en fullereno, en los que al desproteger las unidades sacarídicas no consiguen obtener un espectro de MALDI apropiado mientras que con los derivados acetilados sí que se consiguió.<sup>[75]</sup> El grupo de R. Riguera describe además problemas de fragmentación de dendrímeros que contienen en su estructura cadenas de oligoetilenglicol, observándose pérdidas de oligómeros.<sup>[76]</sup>

Los espectros FT-IR (Figura 4.17) muestran claramente una banda ancha a  $3350\text{ cm}^{-1}$  característica de la vibración de tensión de los grupos hidroxilo que confirman la desprotección. La banda intensa a  $1050\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión asimétrica Si-O-Si permanece tras la desprotección confirmando que la estructura en jaula del silsesquioxano permanece intacta.



**Figura 4.17** Espectro FT-IR de los dendrímeros **32** y **33** con respecto a los compuestos protegidos (p) correspondientes.

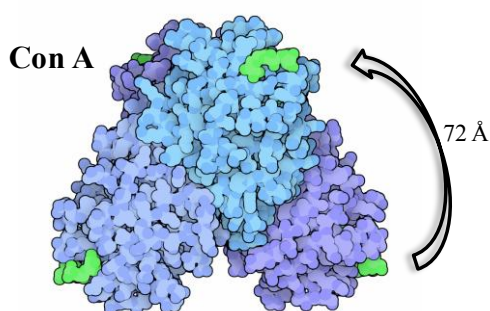
#### **B Estudio de interacción de los dendrímeros de $\alpha$ -D-manosa con núcleo de POSS frente a la lectina concanavalina A**

Los estudios de interacción de los dendrímeros  $\alpha$ -D-manosilados de POSS con lectinas se realizaron en el Instituto de Virología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Maryland (Baltimore, EEUU) en una colaboración con la Dra. B. Trastoy y el Profesor E. J. Sundberg.

Aunque existe un amplio arsenal de técnicas biofísicas con las que caracterizar la interacción específica entre las proteínas y sus ligandos, hemos seleccionado para nuestro

estudio la resonancia de plasmón de superficie (SPR) y la calorimetría de valoración isotérmica (ITC), cuyos fundamentos se explicarán con más detalle a continuación. Cada técnica se basa en un fenómeno físico-químico diferente, por lo que se pueden obtener distintos resultados del análisis dependiendo de la técnica utilizada, que en algunos casos son complementarios.

Se seleccionó la concanavalina A (Con A) como lectina modelo para estos estudios. Es la lectina de leguminosas más estudiada y fue aislada en 1916 de judías del género *Canavalia*. Esta lectina tiene especificidad por  $\alpha$ -D-piranosas como la  $\alpha$ -D-glucosa y la  $\alpha$ -D-manosa que tienen grupos hidroxilos en la misma disposición espacial en C-3, C-4 y C-6. La estructura cuaternaria de esta proteína es dependiente del pH del medio y se presenta como un tetrámero a pH > 7 y como un dímero a pH < 6. Cada monómero (25600 Da)<sup>[77]</sup> tiene un sitio de unión para carbohidratos, además de dos sitios de unión para los cationes metálicos  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  y se necesita la presencia de al menos uno de estos cationes para que se produzca la unión con los carbohidratos.<sup>[78]</sup> La orientación tetraédrica de los monómeros en el tetrámero sitúa los sitios de unión orientados de forma divergente hacia el medio y separados una distancia de unos 72 Å entre sí.<sup>[79]</sup> En la Figura 4.18 se representa de forma simplificada la estructura cristalina del tetrámero de Con A con sus sitios de unión ocupados con carbohidratos.<sup>[80]</sup>

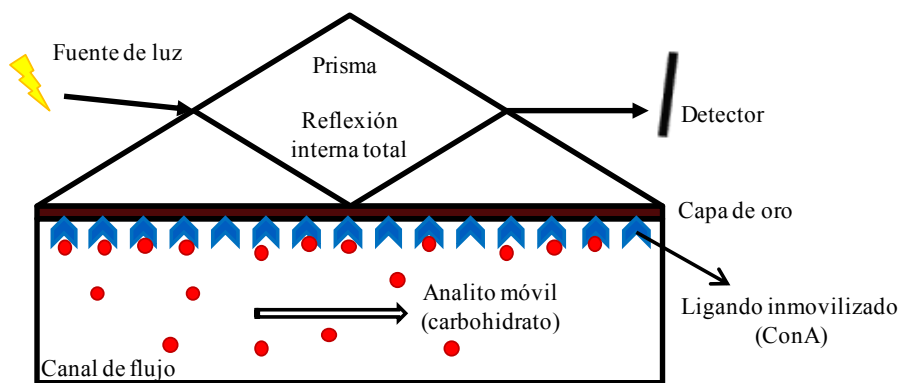


**Figura 4.18** Estructura de la Con A con sus sitios de unión ocupados por monómeros de  $\alpha$ -D-manopiranososa (verde).

Recientemente, la Con A está despertando un gran interés ya que se ha descrito que tiene propiedades antitumorales con actividad antiproliferativa para varias líneas de células cancerígenas y que está involucrada en procesos de apoptosis, autofagia y antiangiogénesis. En la actualidad se están realizando diversos ensayos preclínicos con este fin.<sup>[81]</sup>

### **B.1 Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR)**

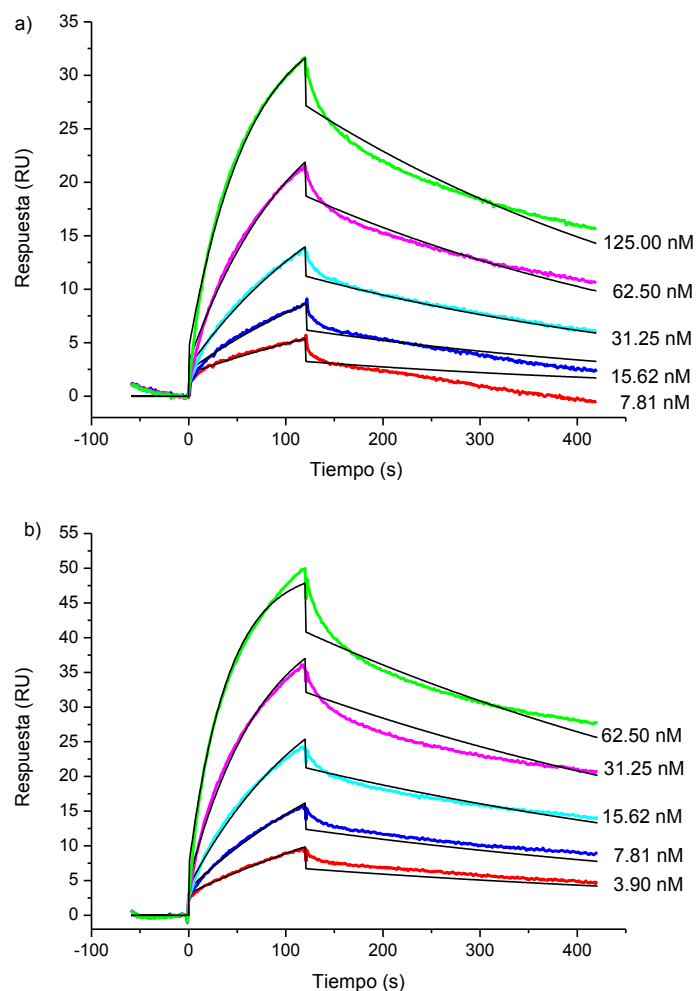
Los plasmones son oscilaciones colectivas de los electrones de la banda de conducción de un metal. La resonancia de plasmón de superficie es un fenómeno óptico que ocurre cuando una luz polarizada se dirige desde una capa de mayor índice de refracción (un prisma) hacia una de menor índice de refracción, que en este caso es una capa metálica de oro o de plata que se sitúa entre el prisma y la muestra. La luz que incide en la interfase entre el metal y el prisma provoca la excitación de los electrones de su superficie que oscilan entonces en resonancia con los fotones generando una onda de plasmón superficial (onda evanescente) y amplificando el campo evanescente en la cara más alejada del metal. Si la capa de metal es lo suficientemente delgada como para permitir al campo evanescente penetrar hasta la superficie opuesta, el efecto será muy dependiente del medio adyacente al metal al otro lado. Este fenómeno sucede sólo cuando la luz incide con un ángulo específico (ángulo de resonancia) que depende de la frecuencia de la luz, del grosor de la capa metálica y del índice de refracción del medio que se encuentra inmediatamente sobre la superficie metálica. La producción de esta resonancia de plasmón superficial absorbe parte de la energía de la luz reduciendo la intensidad de la luz reflejada internamente. Los cambios que tienen lugar en la interfase metal-disolución, provocados por variaciones en la cantidad de materia adsorbida por las interacciones biológicas, pueden ser apreciados detectando los cambios de intensidad de la luz reflejada o del ángulo de resonancia. Esto permite realizar medidas directas en tiempo real, sin necesidad de marcaje, así como el análisis de muestras complejas sin purificación previa y se necesita muy poca cantidad de muestra (Figura 4.19).<sup>[82]</sup>



**Figura 4.19** Esquema de un instrumento de SPR.

Los sistemas de análisis tienen tres componentes esenciales: el chip sensor, el sistema óptico y un sistema de microcanales. El chip sensor es una lámina de vidrio recubierto de una capa fina de oro unida covalentemente a una matriz, generalmente de dextrano carboximetilado, sobre la cual se inmoviliza una de las biomoléculas objeto de estudio (ligando o receptor). El sistema óptico usa un detector de matriz de diodos para monitorizar el valor del ángulo de resonancia que cambia cuando se produce la interacción entre el ligando y el analito. El ángulo de resonancia se expresa en unidades de resonancia (RU): una respuesta de 1000 RU corresponde a un cambio en la concentración de la superficie del chip sensor de  $1 \text{ ng/mm}^2$ . El sistema de microcanales está constituido por un conjunto de canales, bucles y válvulas neumáticas y tiene como función la generación de un flujo constante de la fase móvil que contiene el analito. Esta técnica nos proporciona tanto datos cinéticos, como la constante de velocidad de asociación del analito con el ligando inmovilizado ( $k_{\text{on}}$ ) y del proceso de disociación ( $k_{\text{off}}$ ), como también datos termodinámicos de la interacción, todo ello de forma directa y en el mismo experimento.

Se estudiaron con esta técnica los dendrímeros con espaciador corto **32** (24ManPropPOSS) y largo **33** (24ManTEGPOSS) frente a la Con A a pH fisiológico (7.4) empleando el tampón HEPES 10 mM con NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  1mM y  $\text{MnCl}_2$  1mM. Para ello, se inmovilizó la Con A a pH = 4.5 en un chip sensor CM5 mediante unión covalente (formación de enlace amida) activando previamente los grupos carboxilos de la matriz por reacción con *N*-hidroxisuccinida (NHS) y *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Como control negativo se utilizó TSST-1 (toxina del síndrome del shock tóxico), que no une D-manosa. Se prepararon varias concentraciones de cada uno de los ligandos en el tampón: 125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81 y 3.90 nM y se registraron los sensogramas de la interacción con la Con A inmovilizada (Figura 4.20).



**Figura 4.20** a) Sensograma de **32** (24ManPropPOSS) y b) de **33** (24ManTEGPOSS), frente a Con A inmovilizada. En color negro se muestran las curvas de ajuste a un modelo cinético de unión Langmuir 1:1.

Los datos de los sensogramas se ajustaron a un modelo cinético Langmuir 1:1 a partir del cual se calcularon los parámetros cinéticos que se muestran en la Tabla 4.2. Todas las medidas se realizaron por duplicado mostrándose en la tabla el valor promediado de ambas medidas. A partir de los datos cinéticos obtenidos, se calcularon también las constantes de afinidad para ambos compuestos empleando las expresiones siguientes:  $K_D = 1/K_A$ , donde  $K_A = k_{on}/k_{off}$ . Para ambos compuestos se aprecia una pendiente muy pronunciada para la fase de asociación que indica que se trata de un proceso rápido y, sin embargo, presentan una disociación muy lenta aunque ocurre de forma inmediata sin que haya una fase de meseta durante la inyección del analito (Figura 4.20).

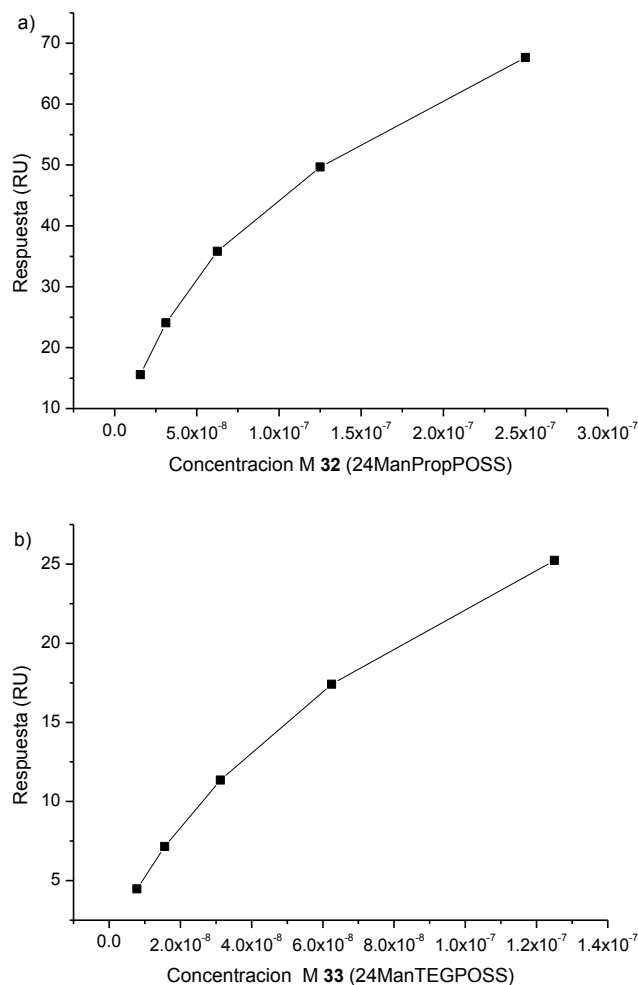
**Tabla 4.2** Datos cinéticos y termodinámicos de la interacción con Con A determinados por SPR.

Compuesto	$k_{on}$ ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	$K_D^{[a]}$ (Langmuir 1:1, nM)	$K_D^{[b]}$ (equilibrio, nM)	$\beta^{[c]}$
1 $\alpha$ -Me-D-Man <sup>[d]</sup>	-	-	-	85500	1
2 8ManPropPOSS <b>18</b> <sup>[e]</sup>	-	-	-	3590	23.8
3 8ManTEGPOSS <b>19</b> <sup>[e]</sup>	-	-	-	3150	27.1
4 24ManPropPOSS <b>32</b>	$2.5 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.2$	$5.3 \pm 1.1$ ( $\beta = 16132$ )	$195.9 \pm 10.4$	436.4
5 24ManTEGPOSS <b>33</b>	$2.3 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1$	$9.5 \pm 0.1$ ( $\beta = 9000$ )	$110.6 \pm 11.0$	773.1

<sup>[a]</sup> Calculados a partir de las constantes cinéticas. <sup>[b]</sup> Calculados por el método del estado estacionario a partir de la respuesta en equilibrio para cada concentración. <sup>[c]</sup> Parámetro definido por Whitesides que mide el incremento de afinidad del compuesto multivalente ( $K_D^{\text{poli}}$ ) con respecto al compuesto monovalente equivalente ( $K_D^{\text{mono}}$ ) y que es igual al valor de la relación  $K_D^{\text{mono}}/K_D^{\text{poli}}$ . <sup>[d]</sup> Valor descrito en la ref. <sup>[10d]</sup> para el  $\alpha$ -D-manopiranosido de metilo. <sup>[e]</sup> Valores descritos en la ref. <sup>[59h]</sup>

A modo de comparación, se han incluido en la Tabla 4.2 los valores descritos para la interacción del  $\alpha$ -D-manopiranosido de metilo con Con A (entrada 1)<sup>[10d]</sup> y de los compuestos octavalentes descritos anteriormente por nuestro grupo (entradas 2 y 3)<sup>[59h]</sup> para mostrar la mejora de la afinidad que se observa al incrementar la valencia y la longitud del espaciador. Para algunos de los compuestos (entradas 1, 2 y 3) no se dispone de datos cinéticos ya que sus sensogramas no pudieron ajustarse al modelo de Langmuir 1:1 debido a una rápida  $k_{on}$  y  $k_{off}$ .

Además de los datos obtenidos a partir de las constantes cinéticas, existe otra forma de calcular las constantes de afinidad termodinámicas basada en los valores máximos de RU medidos en el estado de equilibrio que se asume que el sistema alcanza durante la valoración.<sup>[83]</sup> El valor de la señal de resonancia (RU) máxima en el equilibrio en función de la concentración de cada glico-dendrímico se ajustó a una ecuación hiperbólica de la que se obtuvo la constante de afinidad termodinámica  $K_D$  (Figura 4.21) para los compuestos **32** y **33** (Tabla 4.2). Los valores obtenidos por éste método difieren mucho de los calculados a partir de los parámetros cinéticos, puesto que en el caso de estos compuestos no se alcanzó una meseta apropiada en el equilibrio. Otros autores han atribuido esta diferencia a la existencia de una estabilización adicional por reasociación durante la etapa de disociación lenta, que no puede ser tomada en cuenta con este método de equilibrio.<sup>[10d, 84]</sup>



**Figura 4.21** Respuesta SPR máxima en el equilibrio en función de la concentración de POSS frente a Con A: a) Compuesto **32** (24ManPropPOSS); b) Compuesto **33** (24ManTEG-POSS).

De acuerdo con Whitesides,<sup>[5]</sup> se puede definir la afinidad mejorada (parámetro  $\beta$ ) como el cociente entre la constante de afinidad del compuesto multivalente y la constante de afinidad del derivado monovalente correspondiente (Ecuación 4.1) (Tabla 4.2).

$$\beta = K_A^{\text{poli}} / K_A^{\text{mono}} = K_D^{\text{mono}} / K_D^{\text{poli}} \quad (\text{Ec 4.1})$$

Como cabría esperar, el aumento de la valencia se traduce en un aumento significativo de la afinidad de **32**, que mejora en 16132 veces (768 veces por unidad de manosa) con respecto al  $\alpha$ -D-Me-Man. Aunque los cambios en la afinidad al variar la longitud del espaciador para la misma valencia no son muy significativos, sí que se aprecia que en el

método de equilibrio tiene mayor afinidad el dendrímero de mayor tamaño **33** (24ManTEGPOSS), probablemente porque es más flexible y largo y tiene acceso a un mayor número de sitios de unión de las moléculas de proteína ancladas al chip. Sin embargo, cuando se tiene en cuenta el método cinético y la consecuente estabilización por reasociación durante la última etapa, es el compuesto **32** (24ManPropPOSS) el que presenta una mayor afinidad. El incremento de la longitud del espaciador flexible no siempre beneficia la unión ya que supone unos costes entrópicos más elevados y es probablemente por esta la razón por la que no se obtiene una mejor afinidad para **33**.

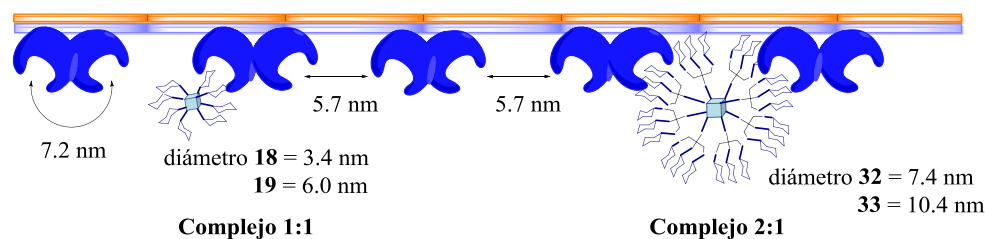
De acuerdo con la ecuación propuesta por Whitesides para la interacción multivalente:<sup>[5, 85]</sup>

$$K_N^{\text{poli}} = (K_{\text{mono}})^{\alpha N} \quad (\text{Ec 4.2})$$

donde  $K_N^{\text{poli}}$  y  $K_{\text{mono}}$  son las constantes de equilibrio de asociación (o disociación) para el sistema polivalente y su equivalente monovalente, respectivamente,  $N$  es el número de interacciones receptor-ligando y  $\alpha$  es el factor de cooperatividad, se puede estimar el valor de  $\alpha N$  (número promedio de interacciones monovalentes ligando-receptor independientes que se producen en cada proceso de unión lectina-dendrímero) a partir de los valores de  $K_D$  (Tabla 4.2). Así, mientras que para los clústeres **18** y **19** con 8 unidades de manosa los valores de  $\alpha N$  calculados son próximos a 1 (1.34 y 1.35 para **18** y **19**, respectivamente), para los dendrímeros de mayor tamaño y valencia este parámetro es aproximadamente 2 (2.03 y 1.97 para **32** y **33**, respectivamente), indicando un carácter bivalente en la interacción con las moléculas de Con A soportadas en el chip, como se ha descrito con anterioridad para dendrímeros de valencia similar.<sup>[10d]</sup> Esta interacción bivalente implica la formación de un complejo ternario con dos unidades sacarídicas de un mismo glico-POSS unidas a 2 moléculas de lectina independientes (Figura 4.22). La formación de complejos quelatos bimoleculares parece posible solo para el caso de los dendrímeros **32** y **33**, ya que las distancias máximas estimadas entre las unidades de manosa para los glico-POSS **18**, **19**, **32** y **33** (medidas desde el carbono anomérico en las conformaciones más extendidas en modelos moleculares calculados empleando el método semiempírico AM1 con optimización total de geometría) son 3.4, 6.0, 7.4 y 10.4 nm, respectivamente, mientras que los sitios de unión de la Con A tetramérica están distanciados aproximadamente 7.2 nm (estructura determinada por difracción de rayos-X).<sup>[11]</sup> Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el complejo con Con A las unidades de manosa están unidas a la proteína mediante enlaces de hidrógeno que implican principalmente a los hidroxilos en los carbonos 3, 4 y 6, de forma que el carbono anomérico y el aglicón se encuentran orientados

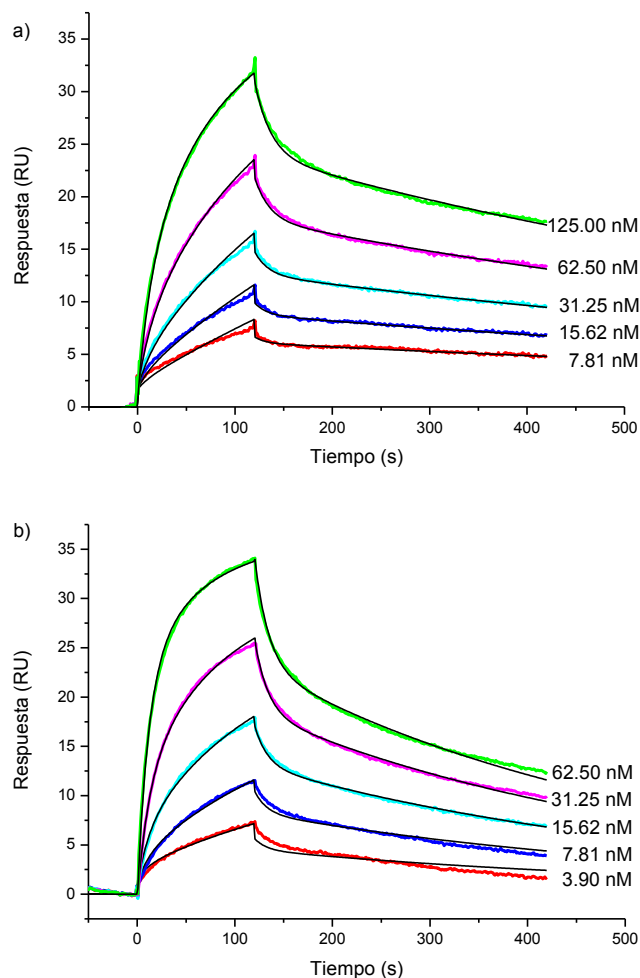


hacia el exterior de la proteína. Para que un mismo glico-POSS pueda orientar adecuadamente dos de sus unidades de manosa en un complejo de tipo quelato con Con A, tendría que tener conectores que permitieran separar entre sí los carbohidratos una distancia al menos 2-3 nm mayor que la distancia entre dos sitios de unión de la proteína (es decir,  $7.2 \text{ nm} + 2 \text{ ó } 3 \text{ nm} = 9.2\text{-}10.2 \text{ nm}$ ). Este requerimiento lo podría cumplir solo el dendrímero **33** aunque incluso en este caso el complejo quelato estaría geométricamente algo tensionado, por lo que tenderá, probablemente, a formar redes intermoleculares entrecruzadas más fácilmente que a la formación de complejos quelato. Los otros glico-POSS, con diámetros inferiores a 9 nm, solo podrán unirse a un mismo tetrámero de Con A de forma monovalente. Podemos estimar a continuación si el modo de unión bivalente glico-POSS/Con A formando un complejo ternario es o no un modelo razonable para explicar la interacción de los compuestos **32** y **33** con la lectina soportada en la superficie del chip. Para ello, se calculó la distancia promedio entre las unidades de Con A soportadas sobre el chip. A partir de los valores de las unidades de resonancia medidos durante la reacción de anclaje de la lectina al chip (2600 RU) y conocida la equivalencia  $1 \text{ RU} = 1 \text{ pg/mm}^2$  (BIAcore), las unidades de resonancia se pueden convertir en densidad superficial molecular y a partir de ella calcular las distancias intermoleculares medias. Dado que en las condiciones de inmovilización de la Con A en el chip sensor ( $\text{pH} = 4.5$ ), ésta se encuentra exclusivamente en su forma dimérica, con un peso molecular de  $<51\,000 \text{ g/mol}$ , se puede calcular que:  $2600 \text{ RU} = 2600 \text{ pg/mm}^2 = 5.10 \times 10^{-14} \text{ mol/mm}^2 = 3.07 \times 10^{10} \text{ moléculas/mm}^2 = 3.07 \times 10^{-2} \text{ moléculas/nm}^2 = 1 \text{ dímero de Con A} / 32.6 \text{ nm}^2$ . De este valor se deduce que la distancia media entre dos dímeros de Con A vecinos será igual a  $\sqrt{32.6} = 5.7 \text{ nm}$ . Este valor es muy similar al estimado por otros autores mediante espectroscopía de ATR-IR para el recubrimiento de Con A sobre una superficie de poliestireno.<sup>[86]</sup> Considerando que las lectinas se distribuyen homogéneamente sobre la superficie y que los diámetros moleculares máximos calculados para los dendrímeros **32** y **33** son 7.4 y 10.4 nm, respectivamente, ambos dendrímeros podrían unirse mediante una interacción bivalente a las lectinas soportadas sobre el chip como se estimó con el parámetro de Whitesides  $\alpha N$  para los valores experimentales de las constantes de disociación (Figura 4.22). Por ello, decidimos realizar un ajuste a un modelo específico para este tipo de interacciones (modelo de dos sitios de unión).<sup>[10d]</sup>



**Figura 4.22** Representación esquemática del complejo ternario estimado por el valor de  $\alpha N$  para los dendrímeros de valencia 24 (**32** y **33**) frente a los de valencia 8 (**18** y **19**) sobre la superficie del chip sensor de SPR.

Basándonos en el valor de  $\alpha N \sim 2$ , se ajustaron de nuevo los sensogramas obtenidos para los dendrímeros **32** y **33** suponiendo una estequiometría de interacción Con A/glico-POSS 2:1.<sup>[10d]</sup> Las nuevas curvas se ajustaron mucho mejor a los datos experimentales (Figura 4.23). Los datos cinéticos y termodinámicos derivados del nuevo ajuste se recogen en la Tabla 4.3. El ajuste según el modelo de dos sitios de unión considera que existen dos tipos de procesos, uno de afinidad micromolar ( $K_{D1}$ , Tabla 4.3) ligado a la primera asociación del glico-POSS al sitio de unión de la lectina (unión monovalente) y otro de afinidad nanomolar ( $K_{D2}$ , Tabla 4.3) debido a los mecanismos de reasociación estadística y entrecruzamiento (y posible formación de quelatos en el caso del dendrímero **33**) característicos de la interacción multivalente. Comparativamente, el dendrímero **32** se une con mayor afinidad que **33** en la primera asociación ( $K_{D1} = 920$  y  $1180$  nM, respectivamente). Sin embargo, considerando el segundo proceso relacionado con los mecanismos multivalentes, **33** se une con mayor afinidad que **32** ( $K_{D2} = 71$  y  $411$  nM, respectivamente). Esto es debido, probablemente, a que el mayor tamaño y flexibilidad de **33** es más apropiado para entrecruzar la lectina como se muestra en la Figura 4.22 y posiblemente también a una contribución de tipo quelato en este caso. Este resultado está de acuerdo con los cálculos estimativos realizados a partir de la densidad de lectina en la superficie del sensor y las dimensiones calculadas para estas moléculas.



**Figura 4.23** a) Sensograma con ajuste 2:1 de **32** (24ManPropPOSS) y b) Sensograma de **33** (24ManTEGPOSS), frente a Con A inmovilizada.

**Tabla 4.3** Datos cinéticos y termodinámicos de interacción con Con A determinados por SPR según un modelo 2:1.<sup>[10d]</sup>

Compuesto	$k_{on}$ ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	$K_D^{[a]}$ (2:1, nM)
24ManPropPOSS ( <b>32</b> )	$k_{on1} = 0.5 \pm <0.1$ $k_{on2} = 0.017$	$k_{off1} = 46 \pm 0.4$ $k_{off2} = 0.7 \pm <0.1$	$K_{D1} = 920 \pm 16$ $K_{D2} = 411 \pm 120$
24ManTEGPOSS ( <b>33</b> )	$k_{on1} = 0.5 \pm <0.1$ $k_{on2} = 0.014$	$k_{off1} = 59 \pm 0.5$ $k_{off2} = 0.1 \pm <0.1$	$K_{D1} = 1180 \pm 20$ $K_{D2} = 71 \pm 10$

[a] Calculados a partir de las constantes cinéticas. Las muestras se midieron por duplicado.

Se repitieron las medidas de SPR a distintos tiempos tras la disolución de las muestras de POSS para comprobar el efecto de la hidrólisis paulatina de los glicodendrimeros de POSS sobre la interacción con Con A. Se registraron los sensogramas de las muestras disueltas tras 0, 4.5, 9, 24 y 48 horas y se estudió la variación en  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y  $K_D$  con el tiempo de hidrólisis. Se observa que la afinidad va empeorando con el transcurso del tiempo como resultado de la hidrólisis, como cabría esperar por la disminución de la valencia (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4** Variación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de la interacción de **32** y **33** con Con A en función del tiempo debida a la hidrólisis paulatina del armazón de POSS (según un modelo Langmuir 1:1).

24ManPropPOSS <b>32</b>				24ManTEGPOSS <b>33</b>		
t / h	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_D$
0	$2.5 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.2$	$5.3 \pm 1.1$	$2.3 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1$	$9.5 \pm 0.1$
4.5	$2.5 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.1$	$17 \pm 8.0$	$1.8 \pm 0.2$	$2.0 \pm 0.2$	$11.7 \pm 3.0$
9	$0.7 \pm 0.1$	$2.6 \pm 0.1$	$36 \pm 2.8$	$2.4 \pm 0.7$	$1.6 \pm 0.3$	$6.1 \pm 2.2$
24	$0.7 \pm 0.1$	$3.1 \pm 0.1$	$43 \pm 5.6$	$1.3^{[a]}$	$4.3^{[a]}$	$31^{[a]}$
48	$0.5 \pm 0.1$	$2.3 \pm 0.3$	$46 \pm 21.1$	$1.6 \pm 0.3$	$4.2 \pm 1.2$	$26.3 \pm 12.2$

$k_{on}$  ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $k_{off}$  ( $\text{s}^{-1}$ ),  $K_D$  (nM). <sup>[a]</sup>No se realizaron medidas por duplicado en este caso.

Se observa un incremento en la  $K_D$ , es decir, un detrimento de la afinidad a lo largo del tiempo que es más notable en el dendrimer con menor longitud de espaciador **32** (24ManPropPOSS). Probablemente esta diferencia se deba a una hidrólisis más lenta del dendrimer de mayor tamaño (**33**).

Hay que tener en cuenta que en los ensayos de SPR la lectina se encuentra soportada en la superficie del sensor por lo que el efecto de entrecruzamiento no puede darse de igual manera que en disolución. Normalmente, se observan diferencias de varios órdenes de magnitud al comparar las afinidades de los compuestos multivalentes estimadas mediante técnicas en disolución que cuando una de las especies está soportada.<sup>[84]</sup>

## B.2 Calorimetría de Valoración Isotérmica (ITC)

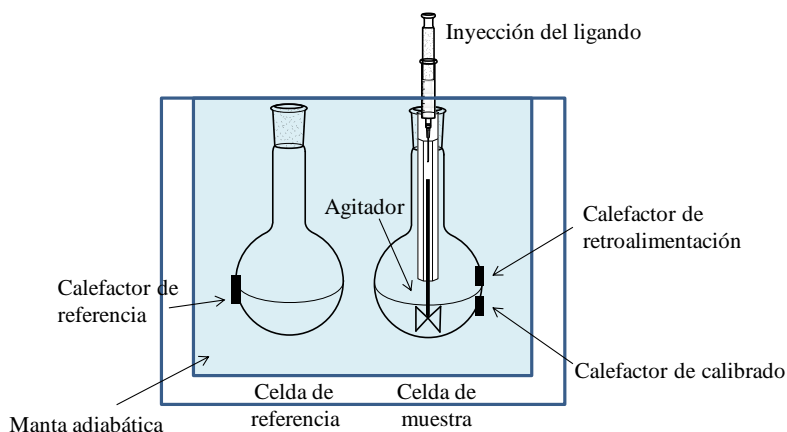
La ITC permite determinar de forma cuantitativa los parámetros termodinámicos de las interacciones químicas midiendo el calor que se absorbe o desprende durante el proceso. Se pueden medir directamente constantes de afinidad ( $K_A$ ), cambios de entalpía ( $\Delta H$ ) y la estequiometría ( $n$ ) de la interacción entre dos o más moléculas en disolución. De este modo es

posible calcular la energía de Gibbs ( $\Delta G$ ) y la variación de la entropía ( $\Delta S$ ) del proceso mediante la ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Ec 4.3})$$

donde  $R$  = constante universal de los gases ideales y  $T$  = temperatura absoluta.

Instrumentalmente, un calorímetro está compuesto por dos celdas idénticas hechas de un material conductor térmico altamente eficiente recubierto por una manta adiabática (Figura 4.24). Se emplean circuitos termopila/termopar muy sensibles que detectan las diferencias de temperatura entre la celda de referencia (llena de tampón o agua) y la celda de muestra que contiene la disolución de la macromolécula. Durante el experimento, se añade el ligando a la celda de la muestra en cantidades perfectamente conocidas produciendo o absorbiendo calor del medio dependiendo de la naturaleza de la unión. La información que se recoge es la potencia eléctrica en función del tiempo que el sistema necesita aplicar para mantener la celda de muestra y la de referencia a la misma temperatura.<sup>[87]</sup>

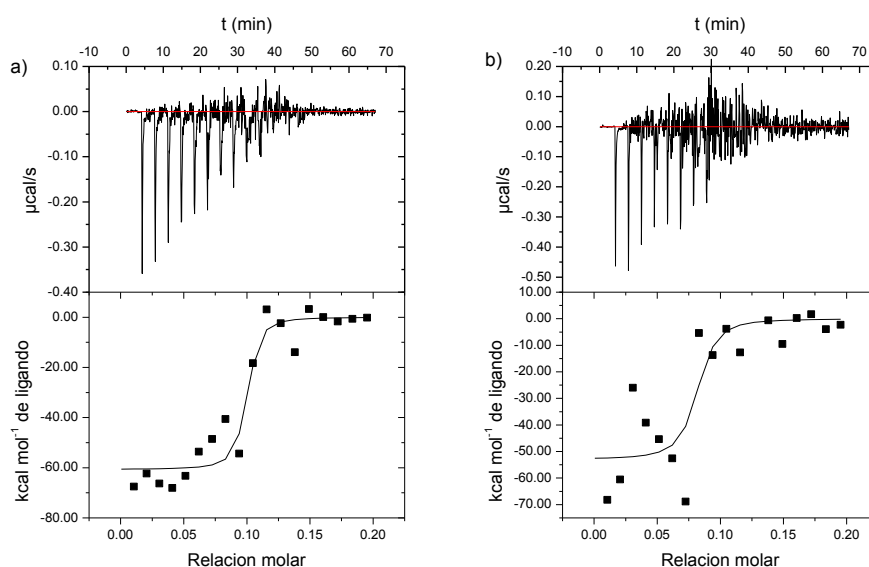


**Figura 4.24** Esquema de un instrumento de ITC

En una reacción exotérmica, la temperatura de la celda de muestra aumenta a medida que se adiciona el ligando. Esto provoca una disminución de la potencia eléctrica aplicada al calefactor de la celda de muestra para mantener las temperaturas iguales en las dos celdas. En una reacción endotérmica, ocurriría lo contrario, el circuito de retroalimentación aumenta la potencia aplicada para mantener la temperatura constante. Los datos se expresan como las  $\mu\text{cal/s}$  necesarias para mantener la celda de muestra y la de referencia a la misma temperatura. Como resultado se obtienen una serie de picos de flujo de calor/inyección que pueden integrarse con respecto al tiempo dando lugar al calor producido en cada inyección. Estos

calores producidos se analizan en función de la concentración molar de ligando y macromolécula usados en el experimento para obtener los parámetros termodinámicos de la unión.

Se valoró la interacción de los compuestos **32** y **33** con Con A mediante ITC. Los experimentos se realizaron introduciendo en la celda de muestra una disolución conocida de Con A en el tampón 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> a pH = 7.4 y valorando los glico-POSS mediante adición controlada a través de la microjeringa. A este valor de pH, Con A se dispone en forma de tetrámero. Se intentaron medir los parámetros termodinámicos y estequiométricos de la unión, pero lamentablemente no se pudieron obtener resultados fiables debido a la inestabilidad en la línea base (Figura 4.25), probablemente debido a la precipitación de la lectina y el glico-POSS como un complejo entrecruzado que debe ser un proceso muy eficiente en el caso de estos glicodendrimeros.



**Figura 4.25** Arriba, perfil de los datos obtenidos por ITC para la interacción de los glicodendrimeros **32** (24ManPropPOSS) (a) y **33** (24ManTEGPOSS) (b) con Con A; abajo, representación de los datos integrados (cuadrados) y la función de ajuste para el modelo de un sitio de unión (línea continua).

Por este motivo, decidimos utilizar otra técnica que nos permitiera estudiar las propiedades termodinámicas de la interacción con las lectinas en disolución. Se eligió para ello la técnica de anisotropía de fluorescencia que requería marcar los glico-POSS con una sonda fluorescente, como se describe a continuación.

#### **4.2.2 Síntesis y estudio de glico-POSS fluorescentes**

##### **A Síntesis y caracterización de glico-POSS marcados con sonda fluorescente**

El uso de agentes de etiquetado ha ayudado en gran medida al estudio de las interacciones biológicas complejas. En particular, el marcaje fluorescente de las biomoléculas se ha convertido en una herramienta indispensable para aplicaciones de diagnóstico por imagen, biosensores o seguimiento de la liberación de fármacos. El empleo de la fluorescencia ofrece ventajas únicas, como su alta sensibilidad y especificidad que la hacen una técnica muy apropiada. Además, la fluorescencia abre la puerta al empleo de otras variantes de la técnica como la anisotropía de fluorescencia, la transferencia de energía entre dos moléculas (FRET: Förster resonance energy transfer), la excitación multifotónica, la emisión inducida por agregación (AIE) y el estudio de los tiempos de vida, siendo todas ellas muy sensibles y dependientes de los cambios que se producen en el entorno próximo al fluoróforo durante las interacciones biológicas.<sup>[66, 88]</sup>

Se utilizan muchos tipos de agentes marcadores fluorescentes. Hasta hace una década se habían utilizado casi exclusivamente fluoróforos orgánicos, tales como fluoresceína y cianina. Sin embargo, con el desarrollo de la biotecnología y los nanomateriales, están cobrando importancia otro tipo de sistemas como las nanopartículas inorgánicas semiconductoras (puntos cuánticos o “*quantum dots*”), complejos de lantánidos, nanopartículas poliméricas biodegradables, dendrímeros y algunas estructuras híbridas orgánico-inorgánicas. Estas nuevas estructuras presentan mejores propiedades ópticas, fotoestabilidad mejorada, mayores desplazamientos de Stokes, estructuración 3D, mejoras de la solubilidad en agua y la biocompatibilidad y permiten además un diseño específico para su aplicación concreta.<sup>[88-89]</sup>

Los silsesquioxanos han sido ampliamente utilizados para la preparación de nanopartículas fluorescentes con potenciales aplicaciones biomédicas. Se les atribuyen efectos de mejora en el rendimiento cuántico de emisión y la fotoestabilidad de los colorantes unidos covalentemente,<sup>[60c, 90]</sup> disminución de la citotoxicidad de otros materiales como los QD,<sup>[91]</sup> favoreciendo el paso a través del endotelio, internalización al citosol e incluso al núcleo celular,<sup>[92]</sup> así como mejora de sus propiedades como vectores para la liberación de genes y fármacos, ya que los dendrímeros con núcleo de POSS encapsulan fácilmente moléculas orgánicas hidrófobas.<sup>[93]</sup>

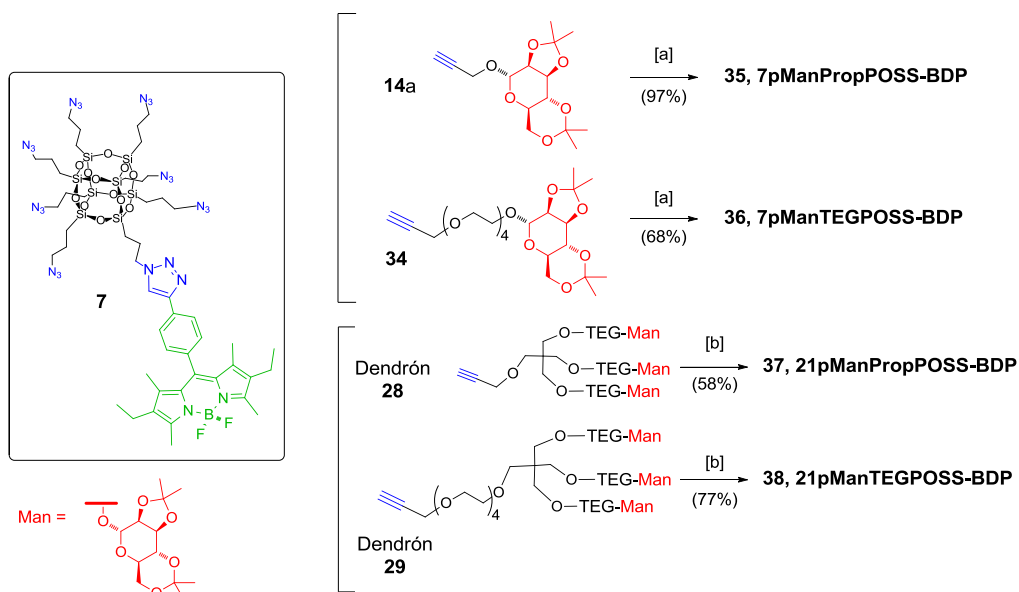
Con estos antecedentes y basándonos en la metodología descrita en el Capítulo 3, se utilizó el POSS heterobifuncional marcado con una sonda fluorescente de la familia de los

BODIPYs y siete grupos azida adicionales (compuesto **7**) para la funcionalización posterior con carbohidratos para obtener así sistemas multivalentes como los descritos con anterioridad. Las propiedades ópticas (eficiencia laser) y fotofísicas así como la mejora en la fotoestabilidad que supone el anclaje covalente del BODIPY al POSS se han descrito en Capítulo 2 del primer bloque de la tesis.<sup>[94]</sup> Su elevada fotoestabilidad hace muy adecuado el sistema BODIPY-POSS para aplicaciones de bioimagen ya que las fuentes de excitación habitualmente empleadas por sus características monocromáticas son los láseres, lo que requiere que los colorantes empleados sean muy estables para evitar el fotoblanqueo y la degradación por la potencia de la irradiación. Adicionalmente, el núcleo de silsesquioxano favorece la disipación del calor con lo que se evita el recalentamiento de las muestras al ser iluminadas.

A pesar de que la fluoresceína es uno de los fluoróforos más ampliamente utilizados en técnicas de bioimagen y en estudios de interacción entre biomoléculas por anisotropía de fluorescencia, los BODIPYs presentan algunas ventajas que los hacen más convenientes. Se ha descrito que, al tratarse de compuestos neutros, se minimiza la interacción entre el cromóforo y la biomolécula objeto de estudio cuando se compara con la fluoresceína, de carácter aniónico.<sup>[95]</sup> La introducción de sustituyentes adecuados en el BODIPY permite desplazar la longitud de onda de emisión convenientemente para evitar interferencias con moléculas coloreadas que puedan dar falsos positivos en las medidas de anisotropía.<sup>[96]</sup> Además, los BODIPYs son menos sensibles al pH del medio y permiten estudiar la interacción en un rango más amplio de condiciones. En 2012, un estudio puso de manifiesto que los BODIPYs meso-sustituídos son mucho más sensibles que otros sistemas a los cambios en la viscosidad del medio en los estudios de anisotropía de fluorescencia.<sup>[97]</sup> Por último, los tiempos de vida del estado excitado de los BODIPYs son generalmente más largos que los de la fluoresceína y rodamina haciendo que su anisotropía de fluorescencia sea más sensible a las interacciones macromoleculares en un rango de pesos moleculares más amplio.<sup>[98]</sup>

Para nuestro estudio se prepararon compuestos con distinta valencia (7 y 21 unidades de  $\alpha$ -D-manopiranosas) marcados fluorescentemente y con espaciadores de distinta longitud, como en el apartado anterior, siguiendo la estrategia descrita en el Esquema 4.5.

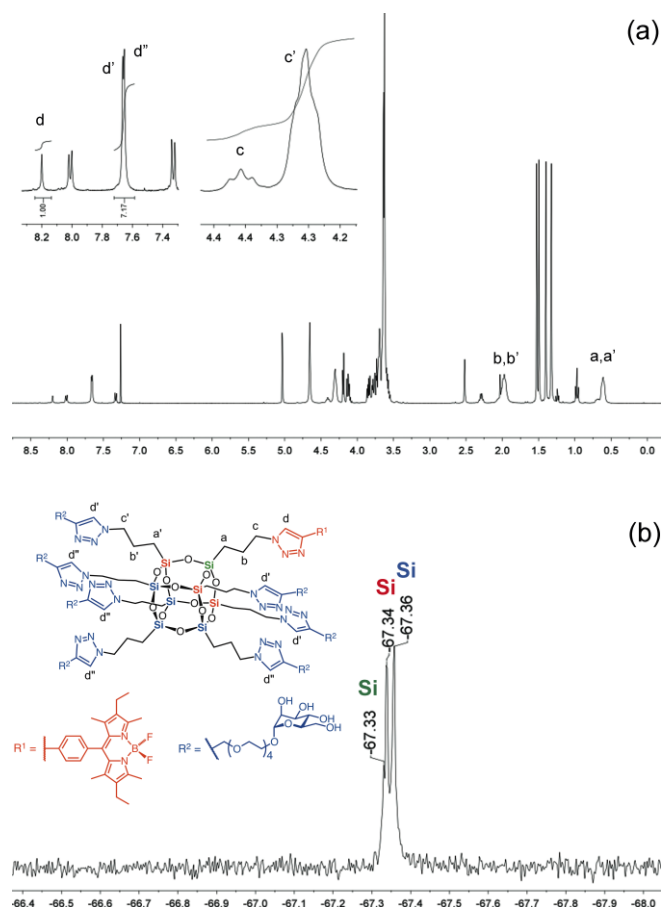




**Esquema 4.5** Síntesis de los derivados  $\alpha$ -D-manosilados multivalentes con etiqueta fluorescente. [a]  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.5 eq.), ascorbato sódico (5 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{H}_2\text{O}$  2:1, t.a., 14-20 h. [b] Cu-tren (0.5 eq.),  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (20 eq.), tolueno, 80 °C (MW), 8-12 h.

La heptafuncionalización del compuesto **7** se llevó a cabo mediante reacción “click” empleando distintas condiciones dependiendo del sistema para dar los productos deseados con rendimientos de buenos a excelentes (58-97%; 92.5-99.6% por grupo azida). Se eligieron las condiciones de Sharpless para la cicloadición con los alquínil-carbohidratos sencillos **14a** y **34**,<sup>[48c]</sup> mientras que con los dendrones trivalentes (dendrones **28** y **29**) se empleó el método con catalizador Cu-tren en tolueno bajo irradiación de microondas como hicimos con los dendrímeros de la sección anterior (Esquema 4.5). Los derivados **35-38** se caracterizaron inequívocamente por espectroscopia de resonancia magnética multinuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) y por espectrometría de masas MALDI-TOF. Se estudiaron también sus propiedades fotofísicas (coeficiente de absorción molar, longitud de onda de emisión de fluorescencia y rendimiento cuántico de emisión) (ver parte experimental). En todos los casos, la introducción del colorante en uno de los vértices del POSS rompe la simetría cúbica de los compuestos (el grupo puntual de simetría de la molécula cambia de  $O_h$  a  $C_{3v}$ ) por lo que se aprecia una relación de integrales 4:3:1 para los protones de los grupos 1,2,3-triazol y 7(4+3):1 en las señales correspondientes a las cadenas de propilo del silsesquioxano en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 4.26, a). Se observa también un desdoblamiento de las señales en el espectro  $^{29}\text{Si}$ -RMN siguiendo un patrón de intensidades 4:3:1 (Figura 4.26, b). Como era de esperar, la dispersión de las señales

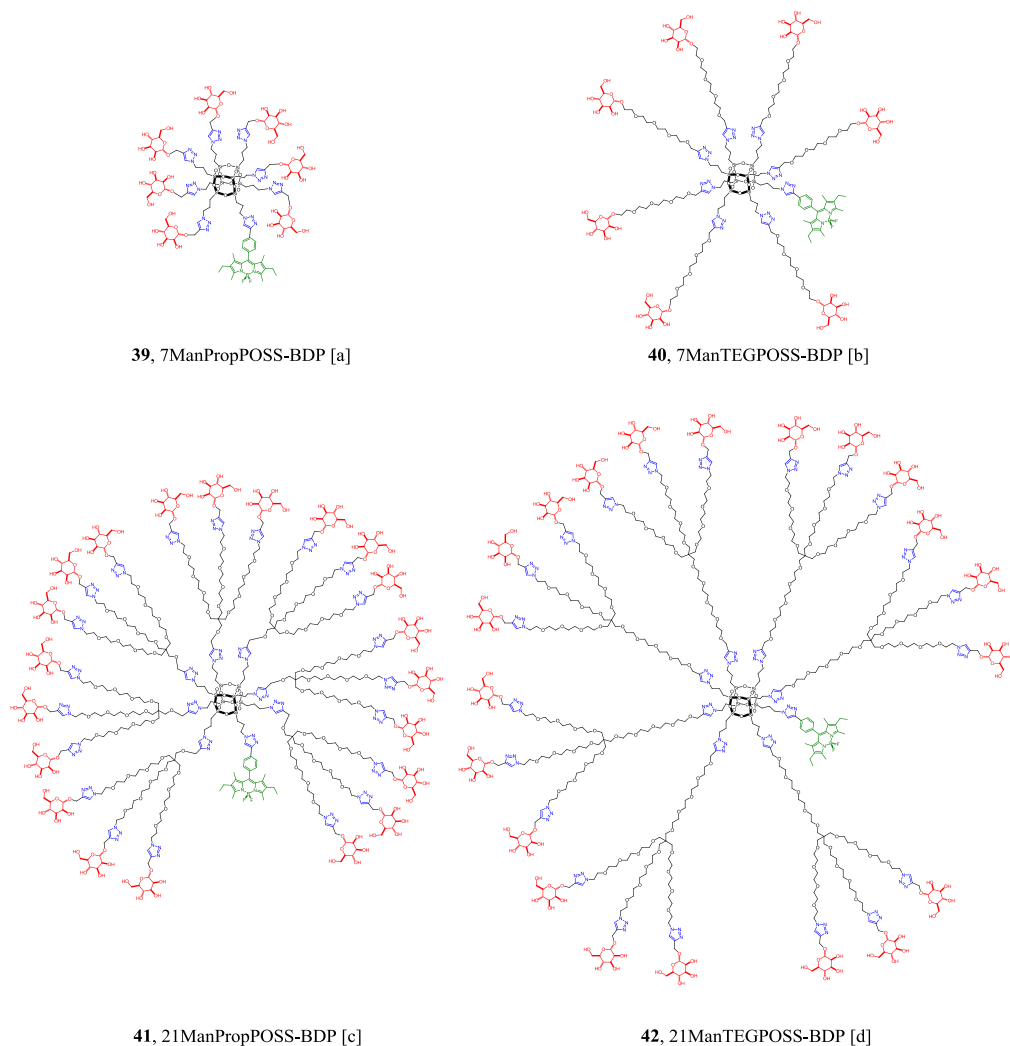
de silicio es mucho más estrecha que la que presentaban los derivados heterofuncionales (monotriazolil-hepta-azida-POSS) descritos en el Capítulo 3 ya que en estos últimos derivados la variación del entorno químico es mayor.



**Figura 4.26** (a) Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y (b) espectro  $^{29}\text{Si}$  RMN (79.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **36** y asignaciones parciales. Los números debajo de la línea del espectro de  $^1\text{H}$  RMN muestran la integral relativa para los protones de triazol.

En los derivados dendriméricos con 21 unidades de manosa se aprecia el mismo patrón aunque la zona de los protones de triazol es lógicamente más compleja (ver espectros en el Anexo).

Los compuestos **35-38** se desprotegeron en condiciones ácidas suaves empleando ácido acético al 80%, como se discutió en la sección anterior, para dar los derivados desprotegidos **39-42**, respectivamente (Esquema 4.6).



**Esquema 4.6** Desprotecciones de los acetales en medio ácido: AcOH/H<sub>2</sub>O 80%, [a] 16 horas, t.a., (100%) [b] 16 horas, t.a. y 3 h a 35 °C, (100%). [c] y [d] 30 h, t.a., 2 h, 38 °C, (100%).

### **B Estudio de interacción con lectinas de los dendrímeros $\alpha$ -D-manosilados de POSS marcados fluorescentemente**

Hemos estudiado la interacción de los derivados **39-42** con Con A en disolución. Ya que los estudios de calorimetría (ITC) con los compuestos equivalentes sin marcador no habían sido satisfactorios, hemos empleado en este caso la técnica de polarización o anisotropía de fluorescencia. Además, como aplicación de los sistemas sintetizados como sondas fluorescentes específicas para imagen celular, se realizó un estudio mediante microscopía

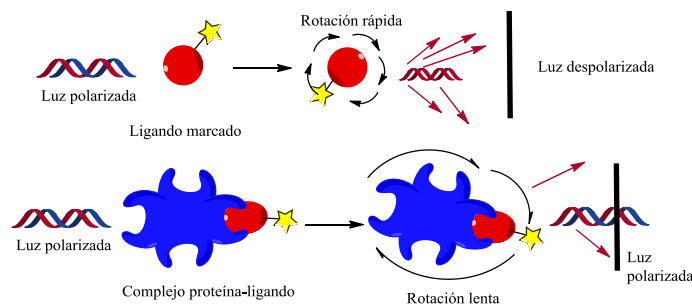
confocal con células K562-CD209<sup>[63]</sup> transfectadas que expresan la lectina DC-SIGN, de gran interés biomédico.

### **B.1 Polarización o Anisotropía de Fluorescencia (FP o AF)**

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Prof. Hakon Leffler del Departamento de Microbiología, Inmunología y Glicobiología de la Universidad de Lund (Suecia) durante una de las estancias realizadas a lo largo de esta tesis.

La polarización de fluorescencia (FP) es una técnica potente y sensible para el estudio de interacciones moleculares. Su base teórica fue descrita por Perrin en 1926.<sup>[99]</sup> La FP se basa en la observación del movimiento molecular de las moléculas fluorescentes en disolución y no requiere la separación física del exceso de ligando o receptor. Cuando se mide la interacción entre carbohidratos y lectinas esta técnica da una medida directa y casi instantánea de la relación de ligando libre o unido a la proteína presente incluso aunque haya ligando libre en exceso. Se emplea para ello luz visible porque la luz ultravioleta no traspasa los filtros de polarización por lo que se requieren como marcadores colorantes con absorción en el rango visible y con alto rendimiento cuántico de emisión fluorescente tales como la fluoresceína o los BODIPYs.<sup>[100]</sup>

La Figura 4.27 ilustra cómo se emplea FP en la medición de la interacción entre las biomoléculas y sus ligandos. Cuando se irradia con luz polarizada una molécula pequeña en disolución (en nuestro caso el carbohidrato con su sonda fluorescente), su vector eléctrico se orienta de forma paralela al campo electromagnético. Durante el tiempo de vida del estado excitado (unos 6 ns para el BODIPY), las moléculas rotan libremente y la luz emitida se despolariza debido al movimiento rápido de la molécula. Sin embargo, cuando la molécula pequeña marcada fluorescentemente está unida al receptor (lectina) que tiene una masa molecular muy grande con respecto a la del ligando, el movimiento del complejo formado está más restringido y su rotación se vuelve más lenta. Cuando se irradia este complejo con una luz polarizada, la luz emitida es, obviamente, menos despolarizada.



**Figura 4.27** Principios de la técnica de polarización de fluorescencia para el estudio de la interacción de las biomoléculas con sus ligandos.

La intensidad de luz emitida se recoge tanto en plano perpendicular de la polarización original ( $I_{\perp}$ ) como en el plano horizontal ( $I_{\parallel}$ ). Podemos obtener el valor de la polarización a partir de la siguiente relación entre las intensidades de fluorescencia en ambas fases horizontal y vertical:

$$P = (I_{\perp} - I_{\parallel}) / (I_{\perp} + I_{\parallel}) \quad (\text{Ec 4.4})$$

donde  $P$  es el valor de la polarización,  $I_{\perp}$  es la intensidad de fluorescencia en la dirección vertical y  $I_{\parallel}$  en la horizontal.

La anisotropía ( $A$ ), es un parámetro análogo a  $P$ , que se define por la siguiente relación:

$$A = (I_{\perp} - I_{\parallel}) / (I_{\perp} + 2I_{\parallel}) \quad (\text{Ec 4.5})$$

$$A = 2P / (3 - P) \quad (\text{Ec 4.6})$$

La anisotropía es adimensional y se utiliza de manera intercambiable con la polarización, ya que están estrechamente relacionadas. A menudo se presentan los datos en forma de anisotropía ya que matemáticamente simplifica los cálculos.<sup>[101]</sup>

En estado sólido (muestra congelada), donde las moléculas no pueden rotar, la anisotropía máxima es 1 (= 1000 mA), ya que no habría despolarización. Sin embargo, en una disolución homogénea las moléculas están orientadas al azar y sólo aquellas con la orientación correcta podrán excitarse con la luz polarizada incidente (excitación fotoselectiva) lo que explica por qué experimentalmente el máximo de anisotropía en el estado congelado es sólo de 0.4 (400 mA). La diferencia de anisotropía entre los estados libre y complejo depende de la cantidad relativa de ligando que haya en el medio, de su tamaño, forma y flexibilidad así como de la constante de afinidad. Por ello, se puede construir una isoterma de la unión mediante una valoración con concentraciones crecientes de la proteína que se adiciona sobre una

concentración fija del ligando con la etiqueta fluorescente. La curva de la unión empezaría en  $A_0$ , que representa el valor de anisotropía del ligando libre. Conforme la concentración de lectina aumenta, la rotación se ralentiza debido a la formación del complejo y el valor de anisotropía aumenta hasta alcanzar  $A_{\max}$ , cuando todo el ligando estaría complejo. Del valor intermedio de la anisotropía se puede calcular la fracción de ligando libre y unido y a partir de estos datos se pueden obtener  $K_D$  y  $K_A$ .

Llevamos a cabo un estudio mediante anisotropía de fluorescencia de la interacción de nuestros glico-POSS marcados fluorescentemente con la lectina modelo Con A. Este estudio consistió en los siguientes ensayos:

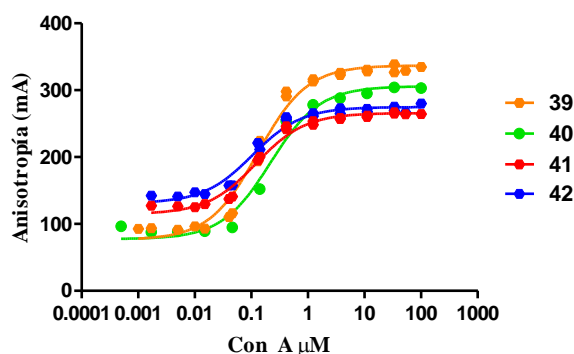
- Estudio de la interacción entre cada uno de los compuestos multivalentes preparados **39-42** (0.1  $\mu\text{M}$ ) y concentraciones crecientes de Con A hasta 100  $\mu\text{M}$  en distintas disoluciones tampón para evaluar la afinidad a distintos valores de pH (7.4, 6.5 y 5.25).
- El mismo ensayo de unión, pero a distintas concentraciones de ligando (0.011, 0.03, 0.1, 0.3, and 0.9  $\mu\text{M}$ ) para estudiar la influencia de la concentración del ligando en la estequiometría de la interacción.
- Ensayo con una concentración fija de Con A (0.5  $\mu\text{M}$ ) y cantidad creciente de ligando. Este ensayo nos permitirá estudiar la curva de interacción a la inversa observando la disociación en lugar de la asociación.
- Experimentos de competición con  $\alpha$ -Me-D-Man y el carbohidrato modelo **17** para estudiar la influencia del espaciador, como habíamos procedido con anterioridad en los estudios mediante SPR,<sup>[59h]</sup> empleando una concentración fija de Con A y ligando y concentraciones crecientes del inhibidor.
- Experimento de competición con el compuesto octavalente **18** (8ManPropPOSS) (equivalente al compuesto **39**, pero sin marcador fluorescente).

#### *Experimentos de interacción a pH 7.4*

La interacción de los glico-POSS se evaluó primero a pH fisiológico empleando una concentración fija de ligando (0.1  $\mu\text{M}$ ) sobre la que se adicionaron concentraciones crecientes de Con A hasta complejar totalmente el ligando (Figura 4.28). Para calcular las constantes del equilibrio de disociación se ajustaron los datos de la curva de la valoración a un modelo de interacción 1:1 según la ecuación siguiente:

$$A = A_0 + (A_{\max} - A_0) \times ([\text{Con A}] / (K_D + [\text{Con A}])) \quad (\text{Ec 4.7})$$

Los estados iniciales de la curva en los que la concentración de proteína es cero representan el valor de la anisotropía del ligando libre,  $A_0$ . Estos valores siguen la tendencia que cabría esperar en base a su tamaño molecular relativo de forma que  $A_0$  sigue la tendencia  $39 \leq 40 < 41 < 42$  (Tabla 4.5). Los valores de  $A_{\text{máx}}$  correspondientes a la meseta del final de la curva en la que todo el ligando está complejoado, dan información acerca de la anisotropía del complejo glico-POSS/Con A. Aparentemente, el complejo o red formado a partir de los dendrímeros con 21 carbohidratos (**41** y **42**) es menor que el generado a partir de los compuesto con 7 manosas (**39** y **40**) y sin embargo la capacidad de reticulación (formación de complejo entrecruzado) de los dendrímeros **41** y **42** es mayor que la de los derivados de menor valencia. Este resultado, *a priori* contradictorio, puede explicarse mediante el efecto “propeller”.<sup>[102]</sup> Se trata de un efecto de despolarización debido a la flexibilidad y al tamaño de la molécula, de forma que los valores de anisotropía alcanzados no dependen sólo de la rotación del complejo final ligando-proteína sino de la rotación del cromóforo por sí sólo. En los dendrímeros de mayor tamaño, el BODIPY queda más lejos del sitio de unión de la lectina y por tanto su rotación está menos restringida lo que se traduciría en un estado final de anisotropía ( $A_{\text{máx}}$ ) inferior al que correspondería para el tamaño del complejo formado (ver Figura 4.28 y Tabla 4.5).



**Figura 4.28** Valoración de AF de los glico-POSS **39-42** frente a Con A en tampón HEPES, a pH 7.4 y t.a.

**Tabla 4.5** Resultados de la valoración de los glico-POSS frente a Con A.

	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>
$A_0$ (mA)	$76 \pm 6$	$77 \pm 4$	$115 \pm 5$	$131 \pm 5$
$A_{\text{máx}}$ (mA)	$337 \pm 4$	$306 \pm 3$	$266 \pm 3$	$275 \pm 3$
$K_D$ (nM)	$131 \pm 16$	$218 \pm 21$	$121 \pm 17$	$105 \pm 17$

Los experimentos se realizaron por triplicado para los compuestos **39-40** (7 Man) y por duplicado para **41-42** (21Man).

Los resultados obtenidos en las curvas de valoración de AF (Figura 4.28) implican que se está produciendo un efecto “propeller” más importante cuanto mayor es el tamaño y flexibilidad de la molécula. Así, los compuesto **40** y **41**, en los que el carbohidrato está unido al POSS con el BODIPY a través de una cadena de TEG estarían despolarizados con respecto a **39**, que contiene un conector más corto y menos flexible. El dendrímero **42** presenta los epítopos distanciados del núcleo de POSS con dos cadenas de TEG por lo que el efecto de despolarización observado es aún mayor.

Los valores de  $K_D$  calculados a partir del ajuste de las curvas de valoración según el modelo de interacción 1:1 se recogen en la Tabla 4.5. El modelo 1:1 no se adapta bien a sistemas multivalentes como nuestros glico-POSS, especialmente en disolución donde presentan una gran capacidad de entrecruzar a la lectina tetramérica y formar redes. Actualmente, en colaboración con el Prof H. Leffler, estamos trabajando en el desarrollo de un modelo matemático que considere otras estequiometrías de interacción multivalente que se ajusten mejor a los datos experimentales. Además, como se verá en el Capítulo 6, al estudiar la evolución de los valores iniciales de anisotropía  $A_0$  en ausencia de proteína se observó que éstos aumentaban con el tiempo, lo que sugiere la formación espontánea de agregados de los glico-POSS en medio acuoso. Puesto que la formación de agregados debe de interferir en las medidas de anisotropía, los datos requieren ser tratados teniendo en cuenta este proceso de agregación o bien habría que considerar solo la curva correspondiente a  $t = 0$  que presenta el valor de  $A_0$  más bajo y que debe de estar menos afectada por la agregación del glico-POSS. Por todo ello, los resultados aquí recogidos tienen un carácter provisional y comentaremos únicamente las tendencias de los mismos y no sus valores exactos.

Las curvas de valoración muestran una pendiente muy abrupta que no se ajusta a un modelo de interacción 1:1. Como primera aproximación para la búsqueda de un modelo de ajuste más exacto se construyeron los diagramas de Hill, que permiten representar linealmente la ecuación del equilibrio de complejación entre el ligando (L) y la proteína (P) en función de la estequiometría de la interacción, como muestran las ecuaciones 4.8-4.10.

$$nP + nL \rightleftharpoons P_nL_n$$

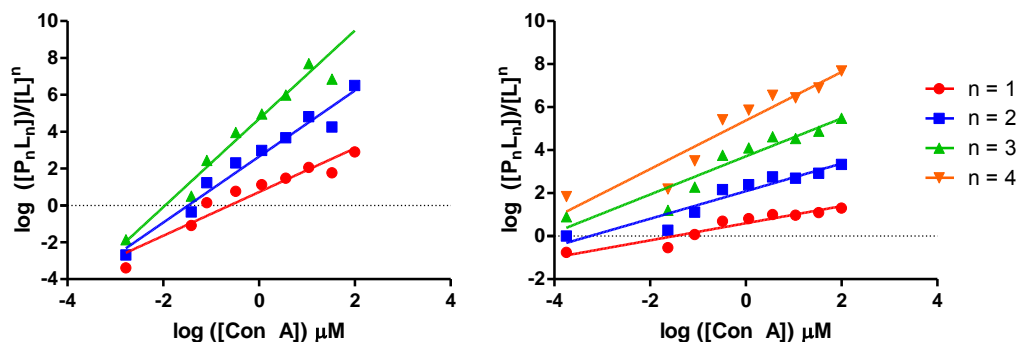
$$K_D = [P]^n [L]^n / [P_nL_n] \quad [P_nL_n]/[L]^n = [P]^n / K_D \quad (\text{Ec 4.8 y 4.9})$$

$$\log [P_nL_n]/[L]^n = n \cdot \log [P] - \log K_D \quad (\text{Ec 4.10})$$

Se representó el diagrama de Hill para una estequiometría 2:2 (Figura 4.29,  $n = 2$ ) y se observó un mejor ajuste de los datos experimentales que en el modelo 1:1, sin embargo,



también se ajustaron razonablemente bien a otros modelos como el 3:3 (Figura 4.29). Todo ello sugiere que los glico-POSS interaccionan con la Con A en un proceso cooperativo y con una estequiometría superior a 1:1 aunque es difícil determinarla de manera exacta.

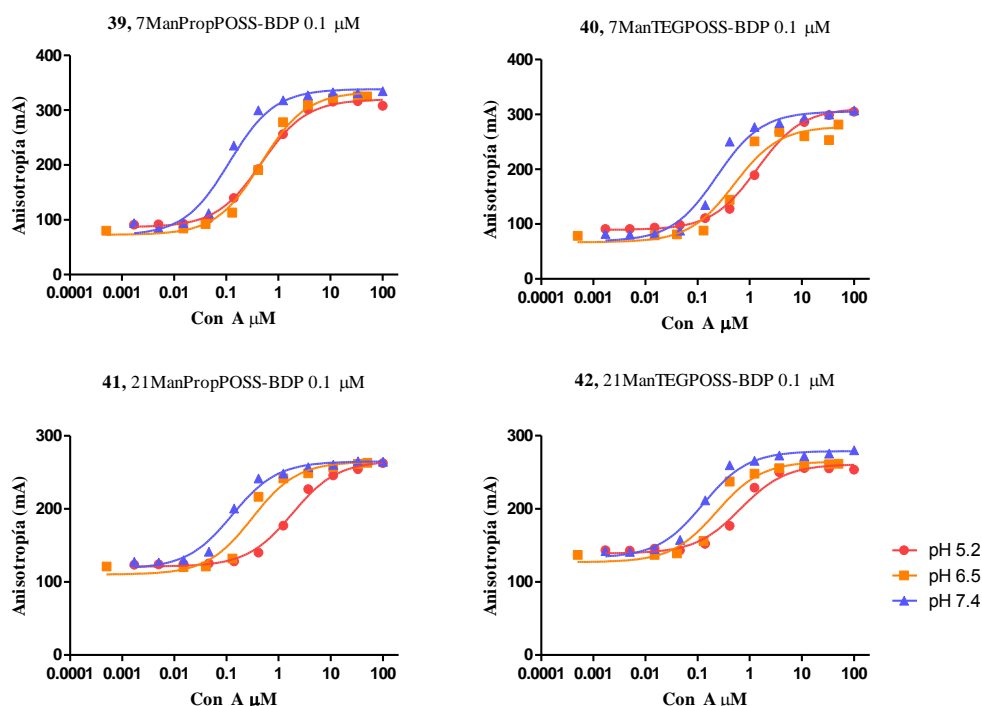


**Figura 4.29** Diagramas de Hill del glico-POSS **39** (derecha) y **42** (izquierda) para distintas estequiometrías de interacción con Con A.

#### *Efecto del pH sobre el equilibrio de complejación*

Hay que tener en cuenta que, como se dijo con anterioridad, el estado de agregación de la Con A es dependiente del pH. A pH fisiológico se encuentra formando un tetrámero, mientras que a  $pH < 6$  se encuentra en forma de dímero. El peso molecular del monómero es de 25.5 KDa y cada monómero contiene un sitio de unión para carbohidratos. Se estudió así la interacción de los glico-POSS frente a la Con A en distintos medios tamponados:

- pH 7.4 con HEPES 10 mM, 150 mM de NaCl, 1 mM  $CaCl_2$  y 1 mM  $MnCl_2$
- pH 6.5 con HEPES 10 mM, 150 mM de NaCl, 1 mM  $CaCl_2$  y 1 mM  $MnCl_2$
- pH 5.25 con NaOAc 50 mM, 150 mM de NaCl, 1 mM  $CaCl_2$  y 1 mM  $MnCl_2$



**Figura 4.30** Curvas de valoración por AF de los ligandos multivalentes **39-42** frente a Con A a distintos valores de pH. En todos los casos, la concentración de Con A está expresada en términos del tetrámero.

La interacción más fuerte se da a pH fisiológico, en el que la lectina se encuentra en su forma tetramérica presentando 4 sitios de unión de carbohidratos. Se observa que se alcanza aproximadamente el mismo valor de  $A_{\max}$  independientemente del pH lo que sugiere que son los glico-POSS los puntos de mayor entrecruzamiento y los que determinan por tanto el tamaño final de la red. A medida que disminuye el pH las curvas se desplazan hacia la derecha en el eje de abscisas (Figura 4.30) por lo que aumenta el valor de  $K_D$  indicando una disminución de la afinidad de los ligandos (Tabla 4.6).

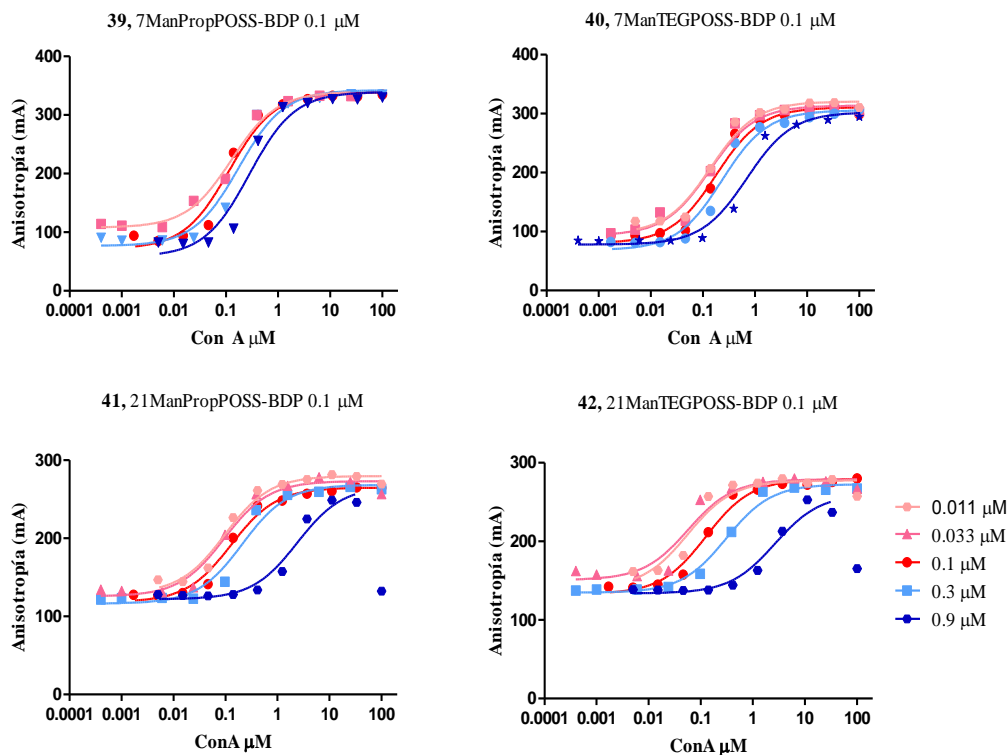
**Tabla 4.6** Valores de  $K_D$  (nM) de los glico-POSS frente a Con A a distintos valores de pH.

	39	40	41	42
pH 5.2	471 ± 42	1384 ± 183	1819 ± 230	664 ± 143
pH 6.5	466 ± 67	502 ± 184	311 ± 99	231 ± 81
pH 7.4 <sup>[a]</sup>	131 ± 16	218 ± 21	121 ± 17	105 ± 17

<sup>[a]</sup> Sólo los experimentos a pH 7.4 se realizaron por duplicado.

*Ensayo de interacción en función de la concentración de ligando a pH 7.4*

Llevamos a cabo el mismo ensayo de interacción con distintas concentraciones de ligando (0.011, 0.033, 0.1, 0.3, y 0.9  $\mu\text{M}$ ) para ver cómo influye la concentración del ligando en la interacción, determinar la concentración óptima para cada glico-POSS y estudiar la saturación de la lectina por el ligando. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.31.



**Figura 4.31** Curvas de valoración de AF de los glico-POSS **39-42** a distintas concentraciones fijas frente a Con A en tampón HEPES a pH 7.4 y t.a. Para los compuestos **41** y **42** se excluyeron del ajuste los últimos puntos de las valoraciones a 0.9  $\mu\text{M}$  debido a la turbidez del pocillo generada por el alto grado de entrecruzamiento de la proteína.

En todos los casos, los valores de  $A_0$  y  $A_{\text{máx}}$  para cada compuesto fueron aproximadamente independientes de la concentración empleada (Figura 4.31). Sin embargo, se observó un desplazamiento de las curvas en función de la concentración. Así, el aumento de concentración desplaza las curvas hacia la derecha en el eje de abscisas, lo que implica una unión más débil con la proteína y un valor de  $K_D$  más elevado (Tabla 4.7). Este efecto es más acentuado en el caso de los dendrímeros de mayor valencia (compuestos **41** y **42**), probablemente debido a que saturan más fácilmente la lectina ya que tienen más sitios de unión. Para todos los compuestos, la concentración óptima de ligando a la que se obtiene un

menor valor de  $K_D$  es 0.033  $\mu\text{M}$  (Tabla 4.7). Por debajo de esta concentración ya no se observa una mejora significativa en la afinidad, posiblemente porque al aumentar la dilución del ligando disminuye la probabilidad de que un mismo tetrámero de Con A se pueda unir a más de una molécula de ligando produciendo el entrecruzamiento de la lectina.

**Tabla 4.7.** Valores de  $K_D$  (nM) obtenidos a partir de las valoraciones de glico-POSS a distintas concentraciones fijas frente a Con A en HEPES a pH 7.4 y t.a.

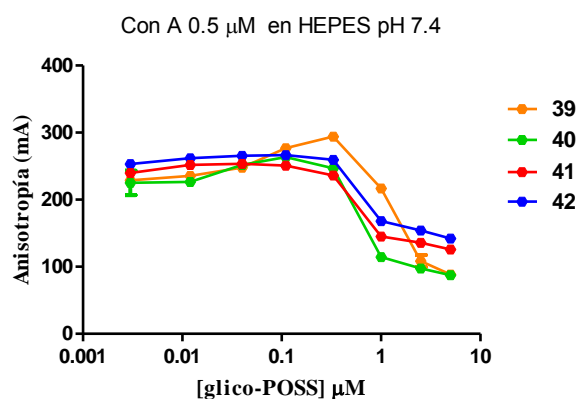
glico-POSS ( $\mu\text{M}$ )	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>
0.011	-	$141 \pm 37$	$97 \pm 26$	$57 \pm 27$
0.033	$128 \pm 26$	$135 \pm 36$	$94 \pm 28$	$58 \pm 25$
0.100	$131 \pm 16$	$218 \pm 21$	$121 \pm 17$	$105 \pm 17$
0.300	$174 \pm 53$	$233 \pm 59$	$209 \pm 65$	$308 \pm 60$
0.900	$281 \pm 98$	$696 \pm 188$	$2399 \pm 822$	$2652 \pm 1045$

En los dendrímeros con 21 unidades de carbohidrato a altas concentraciones de Con A, se observan puntos con una anisotropía mucho más baja de lo esperado, debido al alto grado de entrecruzamiento lectina-carbohidrato-lectina en esos puntos del experimento que da lugar a redes muy entrecruzadas que precipitan y provocan turbidez en la muestra interfiriendo en la medida. La disminución de afinidad que se observa al aumentar la concentración de glico-POSS empleada en la valoración es reflejo probablemente de la saturación de los sitios de unión de la lectina que, por ello, se comporta bajo estas condiciones como un receptor monovalente.

*Ensayo de interacción a concentración fija de Con A y concentración creciente de ligando*

Este experimento debería dar curvas con la forma inversa a la curva de unión empezando por una meseta correspondiente a la  $A_{\text{max}}$  ya que todo el ligando que se adiciona se compleja en presencia del exceso de proteína y la curva va decreciendo a medida que se adiciona ligando hasta que se alcanza un valor de  $A_0$  correspondiente al ligando libre una vez están saturados todos los sitios de unión de la Con A presente. Al principio de la curva, el ligando y la proteína están muy diluidos, por lo que cabría esperar que el complejo que se forma sea monovalente glico-POSS/Con A. Los estados iniciales (ligando complejoado) no deberían ser iguales para los cuatro glico-POSS puesto que, como ocurría en la Figura 4.28, los complejos finales están afectados por el efecto “propeller” por lo que el complejo formado por

el glico-POSS **39** y, en menor medida, el formado por **40** deberían presentar anisotropías superiores a las de los dendrímeros **41** y **42**. Los valores inferiores a los esperados que se observan para **39** y **40** se deben a que la afinidad de ambos ligandos no es suficiente para la complejación completa con la proteína en la disolución de forma que en estos primeros puntos de la curva estarían conviviendo el complejo y el ligando libre con un valor de anisotropía consecuentemente menor. Como la anisotropía observada se promedia ponderadamente para la mezcla de ambas especies, el resultado se traduce en un valor de  $A_{max}$  inferior.



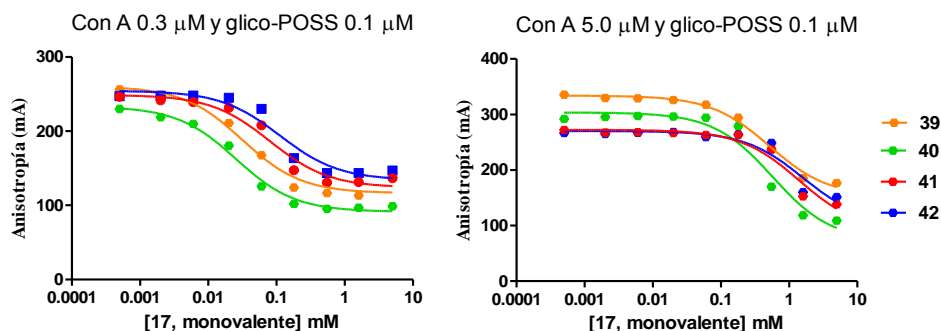
**Figura 4.32** Valoración de los glico-POSS **39-42** empleando concentraciones crecientes de glico-POSS frente a una concentración fija de Con A 0.5  $\mu$ M en tampón HEPES a pH 7.4 y t.a.

Además, en la Figura 4.32 se observa un máximo en la curva del compuesto **39** (7ManPropPOSS-BDP) y, en menor medida, también para **40** (7ManTEGPOSS-BDP), por encima de la meseta esperada. Los máximos observados en las curvas de **39** y **40** se deben a su relativamente baja afinidad que no es capaz de saturar los 0.5  $\mu$ M de Con A a bajas concentraciones de ligando, como se comprobó también en los ensayos de inhibición que se describen a continuación (Figura 4.34). Los dendrímeros **41** y **42**, por el contrario, saturaron bien siempre los 0.5  $\mu$ M de Con A y dieron curvas con una forma inversa a las que se obtuvieron al realizar la valoración con concentración fija de ligando y creciente de lectina (Figura 4.28). Los valores finales de anisotropía de estas curvas, que deben corresponder a los valores del ligando libre, correlacionan bien con los valores de  $A_0$  determinados en la valoración a concentración fija de ligando y creciente de lectina (Figura 4.28).

*Ensayos de competición*

Se hicieron ensayos de inhibición competitiva en los que se valoró una concentración fija del complejo lectina-ligando (concentración fija de Con A y de ligando) con concentraciones crecientes de otro ligando distinto, al que denominaremos inhibidor para diferenciarlo de nuestros glico-POSS, capaz de desplazar al ligando original del sitio de unión. Es importante señalar que en estos experimentos partimos de un complejo preformado del glico-POSS y la proteína. En presencia de Con A, los agregados de glico-POSS (Capítulo 6) se disgregan a su forma monomérica para formar el complejo con la lectina. El inhibidor desplazará al glico-POSS del sitio de unión de la Con A sin que interfiera en este proceso la agregación del glico-POSS. Por este motivo, los experimentos de competición llevados a cabo resultan de gran utilidad ya que permiten separar ambos procesos: equilibrio de agregación del ligando y equilibrio de complejación con la lectina. Además, permiten calcular indirectamente las constantes de disociación de los ligandos cuando éstos no están fluorescentemente marcados si se emplea un inhibidor fluorescente.<sup>[103]</sup>

Estos experimentos se realizaron en condiciones saturantes de ligando (glico-POSS 0.1  $\mu\text{M}$  y Con A 0.3  $\mu\text{M}$ ), garantizando así que todos los sitios de unión de la lectina estén ocupados, y también en condiciones de exceso de la proteína (glico-POSS 0.1  $\mu\text{M}$  y Con A 5.0  $\mu\text{M}$ ). De los experimentos en condiciones saturantes de ligando, se estimó el valor de  $\text{IC}_{50}$  del inhibidor frente a cada uno de los glico-POSS. El valor de  $\text{IC}_{50}$  es la concentración de inhibidor a la cual se ha conseguido desplazar el 50% del ligando del sitio de unión, por tanto, cuanto mayor afinidad presente el ligando por la Con A mayor será la concentración de inhibidor necesaria para desplazarlo y también el valor de  $\text{IC}_{50}$ . Este ensayo se llevó a cabo empleando  $\alpha$ -D-manopiranosido de metilo (MeMan) y el manósido **17** como inhibidores para comprobar si el espaciador empleado afectaba a la interacción. Puesto que los resultados obtenidos con ambos inhibidores fueron muy similares, se puede concluir que el espaciador elegido no afecta apreciablemente a la interacción con la lectina. A modo de ejemplo, la Figura 4.33 muestra las curvas correspondientes al estudio de competición con el compuesto **17**. Es importante señalar que, puesto que el inhibidor empleado es monovalente, su afinidad es mucho menor y, por tanto, las concentraciones de ligando aparecen expresadas en valores  $\mu\text{M}$  mientras que las de inhibidor se indican en mM (Figura 4.33).



**Figura 4.33** Ensayo de competición con el compuesto monovalente **17** para el complejo pre-incubado de Con A (0.3  $\mu$ M) y glyco-POSS (**39-42**) (0.1  $\mu$ M) en tampón HEPES a pH 7.4 y t.a.

El ajuste de estas curvas según el método descrito<sup>[103]</sup> nos permitió calcular los valores de  $K_i$  y de  $IC_{50}$  que se recogen en la Tabla 4.8. Para ello, los datos de anisotropía ( $A$  en mA frente a concentración de inhibidor,  $[I]$  en  $\mu$ M) se ajustaron a la Ecuación 4.11 simplificada para una interacción competitiva 1:1:

$$A_{no-inh} = A_{no-inh} - (A_{no-inh} - A_0) \cdot \left( \frac{[I]}{(IC_{50} + [I])} \right) \quad (\text{Ec 4.11})$$

donde  $A_{no-inh}$  es el valor de anisotropía en ausencia de inhibidor y  $A_0$  es el valor para la sonda fluorescente (glyco-POSS) en ausencia de inhibidor y de Con A. Además, de forma indirecta, se calcularon los valores de  $K_D$  de los glyco-POSS según la ecuación:

$$K_D = ([L] - [LP]_{no-inh}) \times \frac{([P]_{tot} - [LP]_{no-inh})}{[LP]_{no-inh}} \quad (\text{Ec 4.12})$$

donde  $[L]$  es la concentración de ligando (glyco-POSS),  $[P]$  la concentración de proteína (Con A) y  $[LP]$  la concentración del complejo formado entre ambos. La concentración de complejo en ausencia de inhibidor  $[LP]_{no-inh}$  viene definida por la expresión  $[LP]_{no-inh} = (A_{no-inh} - A_0) / (A_{m\acute{a}x} - A_0) \times [P]_{tot}$ .

En las curvas de competición (Figura 4.33), se observa que los complejos de los compuestos heptavalentes son disociados más fácilmente por el inhibidor que los que tienen valencia 21, como era de esperar ya que la unión de los primeros a la lectina es más débil. El compuesto **42**, con el espaciador más largo y flexible, es más difícil de desplazar del complejo con la proteína como se deduce de los altos valores de  $IC_{50}$  que presentan los dos inhibidores ensayados frente a este compuesto (Tabla 4.8) a pesar de ser éste el que tiene una mayor flexibilidad y, por ello, posiblemente una entropía de complejación más negativa.

**Tabla 4.8** Valores de  $K_i$  e  $IC_{50}$  estimados para los inhibidores  $\alpha$ -metil manósido y **17** frente a cada uno de los glico-POSS (0.1  $\mu$ M) con Con A (0.3  $\mu$ M) en tampón HEPES a pH 7.4 y t.a y valores indirectos de  $K_D$  de los glico-POSS (nM).

		<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>
$\alpha$ -MeMan <sup>[a]</sup>	$K_i$ ( $\mu$ M)	54	74	20	125
	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	220	324	119	427
	$K_D$ (nM)	90	90	60	120
<b>17</b> , ManTEG Bu	$K_i$ ( $\mu$ M)	96	9	14	34
	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	330	28	112	168
	$K_D$ (nM)	120	150	40	70

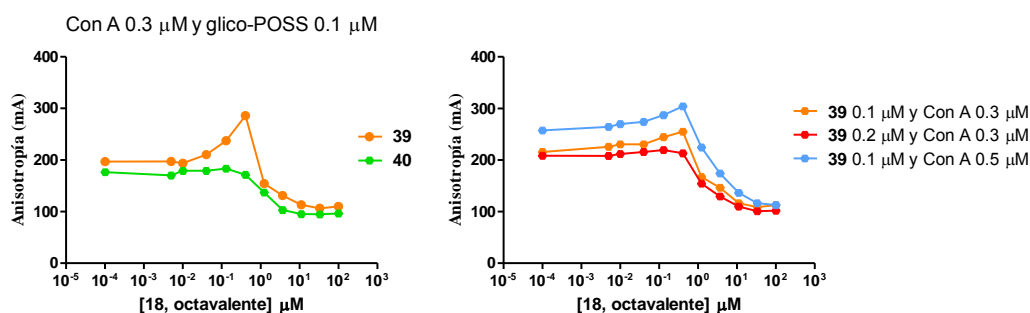
<sup>[a]</sup> Se realizaron por duplicado.

El inhibidor monovalente **17** es el que presenta una mayor similitud estructural con los glico-POSS; del ensayo de inhibición con este compuesto podemos deducir que los dendrímeros con 21 epítomos de manosa (**41** y **42**) son los que tienen mayor afinidad por la Con A ya que presentan los menores valores de  $K_D$  (40 y 70 nM, respectivamente) acompañados de valores elevados de  $IC_{50}$  (112 y 168  $\mu$ M, respectivamente) que indican que son necesarias concentraciones elevadas del inhibidor **17** para desplazar al glico-POSS del sitio de unión de la Con A. El compuesto **39** presenta valores de  $IC_{50}$  más elevados y  $K_D$  menores de lo que cabría esperar en base a los resultados de SPR puesto que es el ligando con menor afinidad. Esto es probablemente debido a que el ajuste de las curvas de **41** y **42** se desvía más de los puntos experimentales en la zona central de la curva (Figura 4.33) demostrando que el modelo 1:1 no es adecuado para los compuestos de mayor valencia. El modelo de interacción 1:1 se desvía más de la realidad en los ensayos en disolución que cuando se tiene la proteína soportada y afecta más a los compuestos con mayor número de epítomos que dan lugar a interacciones más complejas. Probablemente, las  $K_D$  de **41** y **42** calculadas a partir de estos ajustes están sobrestimadas y dichos compuestos presentan afinidades mayores que las calculadas con este modelo.

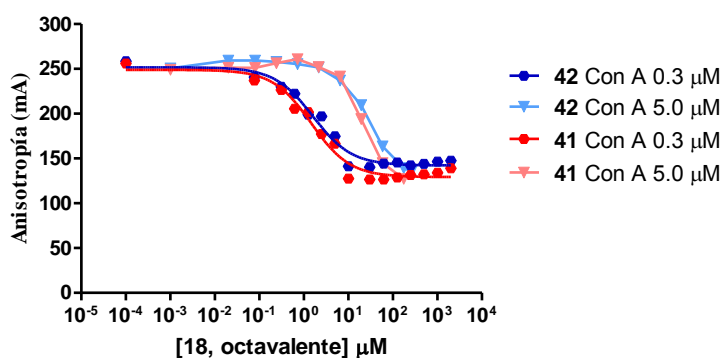
El ensayo llevado a cabo con un exceso de Con A (5  $\mu$ M) (Figura 4.33, derecha) con respecto a la cantidad de ligando (0.1  $\mu$ M), muestra cómo el valor de la anisotropía final es diferente para cada compuesto en función de su tamaño, siendo inferior para los compuestos de mayor tamaño. Este resultado se puede explicar de nuevo como una consecuencia del efecto “propeller”, como se comentó anteriormente.



Se llevó a cabo también un ensayo de competición empleando como inhibidor el compuesto octavalente **18** (8ManPropPOSS), que es el equivalente sin etiqueta fluorescente del compuesto **39** (Figura 4.34). El experimento de competición del compuesto heptavalente **39** (7ManPropPOSS-BDP) muestra un máximo en la curva a un valor de concentración del inhibidor **18** de 0.5  $\mu$ M, que concuerda con lo observado en la valoración que se muestra en la Figura 4.32. Para comprobar si este incremento de anisotropía se debía a que el glico-POSS **39** no ha sido capaz de saturar todos los sitios de unión de la lectina en las concentraciones empleadas y que, por tanto, el complejo es capaz de seguir creciendo uniendo moléculas del inhibidor **18** y del ligando **39** simultáneamente, se realizaron nuevas valoraciones empleando distintas proporciones ligando/proteína (Figura 4.34, derecha). Conforme la proporción glico-POSS/Con A aumenta, el ligando **39** va saturando todos los sitios de unión de la lectina y el máximo va desapareciendo hasta adoptar la forma normal de una curva de inhibición (Figura 4.34, derecha, línea roja). Este resultado sugiere que el compuesto **39** es el que presenta menor afinidad de los cuatro ligandos estudiados.



**Figura 4.34.** Ensayo de inhibición de glico-POSS **39-40** con el compuesto octavalente **18** en tampón HEPES a pH 7.4 y t.a.



**Figura 4.35.** Ensayo de inhibición de los glico-POSS **41-42** 0.1  $\mu$ M y distintas cantidades de Con A con el compuesto octavalente **18** en tampón HEPES a pH 7.4 y t.a.

Las curvas de inhibición para los dendrímeros **41** y **42** se muestran en la Figura 4.35. El hecho de que en las curvas de competición de la complejación de los dendrímeros **41** y **42** usando **18** como inhibidor no se aprecien máximos como los de la Figura 4.34, implica que la proporción Con A/glico-POSS empleada en este caso sí es saturante de forma que todos los sitios de unión de la Con A estarían previamente ocupados por el ligando y no puede unir simultáneamente al inhibidor y provocar esos aumentos de anisotropía anteriormente observados. Dado que tenemos  $0.3\ \mu\text{M} \times 4$  sitios de unión de Con A tetramérica frente a  $0.1\ \mu\text{M}$  de glico-POSS, y considerando que todos los sitios de la lectina estarían ocupados formando complejos con manosa, podemos suponer que 12 de los 21 epítopos disponibles del glico-POSS están unidos a la lectina en el complejo resultando que, en estas condiciones, la estequiometría  $n = 12$ . En disolución, en exceso de proteína la estequiometría Con A/glico-POSS debe ser por tanto  $n \geq 12$  en el caso de los dendrímeros.

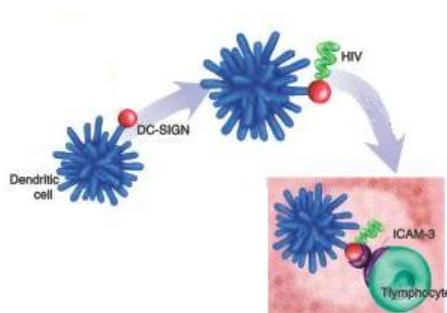
De todo el estudio de complejación de nuestros glico-POSS fluorescentes con Con A que hemos realizado empleando anisotropía de fluorescencia se concluye que, conforme se incrementan la valencia y la longitud del espaciador, aumenta también la afinidad de los ligandos por la lectina. Los ligandos dendriméricos con 21 unidades de manosa mejoran cualitativamente los valores de afinidad obtenidos para los glico-POSS con 7 copias del carbohidrato aunque, debido a que el modelo de ajuste que estamos utilizando no es el más adecuado para sistemas multivalentes en disolución, los valores de  $K_D$  de los ligandos no están bien determinados a nivel cuantitativo y están probablemente sobreestimados.

## **B.2 Aplicación de los glico-POSS fluorescentes como sondas específicas de lectinas (DC-SIGN) en microscopía confocal celular**

Este estudio se llevó a cabo en el Instituto de Oncología del Principado de Asturias, en la Unidad de Otorrinolaringología del Hospital Central de Asturias en colaboración con la Dra. María D. Chiara. Las células humanas transfectadas empleadas en el estudio fueron cedidas por el Dr. Ángel L. Corbi del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

Las lectinas de tipo C (C-type lectin receptors CLRs) son una familia amplia de receptores que presentan un dominio de reconocimiento de carbohidratos dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Un número importante de estos CLRs reconocen oligosacáridos que contienen L-fucosa o D-manosa, como el receptor de manosa (MR) y la lectina DC-SIGN de las células dendríticas y macrófagos (*Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-*

integrin),<sup>[104]</sup> también llamada CD209 (Cluster of Differentiation 209). DC-SIGN en particular ha cobrado un gran interés biomédico desde su descubrimiento en el año 2000,<sup>[105]</sup> porque una glicoproteína de un amplio número de patógenos de gran relevancia clínica, incluyendo el VIH, virus Ébola, Dengue, *Candida albicans* y *Leishmania* entre otros.<sup>[45b]</sup> DC-SIGN promueve la endocitosis del patógeno para la posterior presentación de sus antígenos a los linfocitos T estimulando así su diferenciación y estimula la respuesta inmune. Es por ello que se está estudiando esta lectina para el desarrollo de vacunas potenciales frente a ciertos tipos de cánceres tratando de inducir linfocitos-T específicos contra el tumor (Figura 4.36).<sup>[106]</sup>

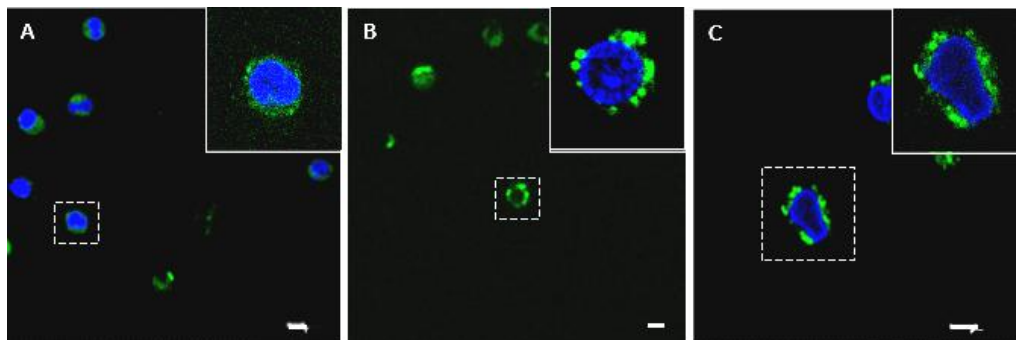


**Figura 4.36** Mecanismo promotor de la respuesta inmune mediada por DC-SIGN.<sup>[107]</sup>

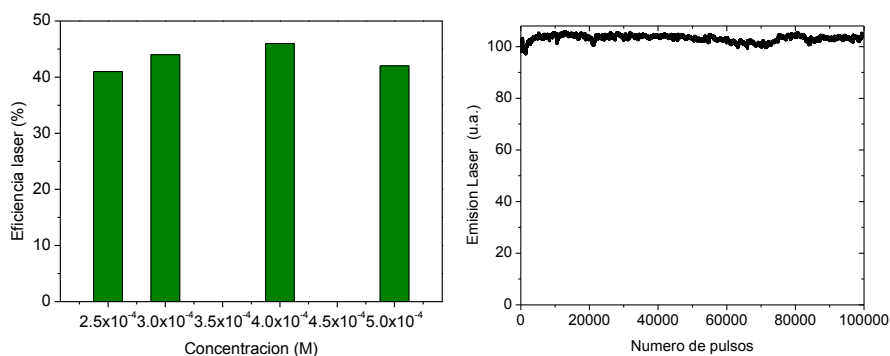
Se han descrito ya varios ejemplos en la literatura en los que se emplean dendrímeros como armazón para la presentación multivalente de compuestos manosilados y fucosilados como ligandos de DC-SIGN.<sup>[108]</sup>

Nosotros hemos estudiado el compuesto **40** (7ManTEGPOSS), que contiene siete epítopos de manosa, por microscopía confocal láser de barrido para visualizar su interacción con la superficie de células humanas dendríticas K562-CD209<sup>[63]</sup> que expresan un alto número de receptores de manósidos en la membrana celular al estar transfectadas con el gen de expresión de DC-SIGN (Figura 4.37, B y C). Se empleó como control el derivado **36** (7-pManTEGPOSS) que tiene los hidroxilos de los azúcares protegidos con grupos isopropilidén acetal y que por tanto es incapaz de unirse a los receptores de manosa (Figura 4.37, A). Ambos compuestos presentan un colorante fluorescente BODIPY unido covalentemente a la estructura de silsesquioxano que les confiere la fotoestabilidad requerida para la irradiación con láser de alta intensidad que utiliza la técnica de microscopía empleada.<sup>[90c]</sup> En la Figura 4.38 se muestran los resultados del estudio de fotoestabilidad que realizamos para el compuesto **36** en fase líquida a la concentración óptima (concentración a la que se alcanza su máxima eficiencia

de emisión láser) ( $4 \cdot 10^{-4}$  M). Para ello, se irradió con el láser un volumen de 10  $\mu$ L de disolución del compuesto en un tubo capilar cerrado. El colorante híbrido resultó ser altamente fotoestable ya que, después de 100000 pulsos a 10 Hz, el compuesto mantiene todavía su emisión láser inicial.



**Figura 4.37** Estudio por microscopía confocal de la interacción del glicoPOSS **36** (panel A) y **40** (paneles B y C) con células transfectadas establemente con K562 que expresan DC-SIGN (K562-CD209). Las células fueron incubadas con los glico-POSS en tampón fosfato salino durante 10 min a 4 °C. El núcleo celular se tiñó a continuación con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se muestran ampliaciones de las células indicadas. Los resultados son representativos para múltiples células en tres experimentos independientes. Barra de escala = 10  $\mu$ m.



**Figura 4.38** Izquierda: Eficiencia láser del compuesto **36** en AcOEt en función de la concentración. Derecha: Medida de la fotoestabilidad, fluorescencia inducida por láser normalizada en función del número de pulsos para una disolución de **36** a una concentración  $4 \cdot 10^{-4}$  M. Energía de bombeo y relación de repetición: 5.5 mJpulso<sup>-1</sup> y 10 Hz, respectivamente.

Las células fueron incubadas con los ligandos durante un tiempo corto (10 min) y a baja temperatura (4 °C) para minimizar en lo posible la internalización por endocitosis del glico-POSS mediada por DC-SIGN. La disociación lenta del receptor que presenta el

compuesto **40** por su carácter multivalente permitió la adquisición de la imagen (temperatura ambiente) tras lavar las células con tampón para eliminar los restos de ligando residual sin unir.

Las imágenes confocales muestran una fluorescencia intensa para el compuesto **40** que se localiza principalmente en la membrana celular (Figura 4.37, B y C) aunque se aprecia una pequeña internalización del ligando al citoplasma a pesar de las precauciones tomadas para evitar la endocitosis. En contraste, las imágenes del compuesto control **36** muestran sólo tinción difusa e inespecífica (Figura 4.37, A). Se comprobó así la especificidad de la unión de los glicodendrimeros con los receptores de la membrana celular.

### **4.3 Conclusiones**

- 1) La estrategia desarrollada previamente para la bifuncionalización controlada de POSS de simetría cúbica se ha demostrado muy efectiva para la síntesis de glicodendrimeros de geometría pseudo-esférica con núcleo de POSS marcados fluorescentemente.
- 2) Los glicodendrimeros sintetizados muestran una alta afinidad por lectinas que reconocen específicamente sus epítopos sacarídicos gracias a un efecto multivalente muy efectivo. La presencia del grupo cromóforo fluorescente permite el estudio de esta interacción mediante anisotropía de fluorescencia. Sobre la base de los resultados obtenidos por SPR, el incremento de la valencia de los glico-POSS de 8 a 24 epítopos (o de 7 a 21 en el caso de los compuestos marcados fluorescentemente) supone una mejora de la afinidad por Con A en más de un orden de magnitud. Los resultados de AF confirman un aumento de afinidad en las medidas en disolución cuando se comparan con las obtenidas mediante SPR para la lectina soportada y demuestran, a nivel cualitativo, una afinidad mucho mayor para los dendrimeros con 21 epítopos que para los glico-POSS con solo 7 sugiriendo además una estequiometría Con A/glico-POSS  $\geq 12$  para los compuestos **41** y **42**.
- 3) La estructura inorgánica del POSS proporciona una mayor fotoestabilidad al colorante covalentemente unido así como un armazón muy adecuado para la presentación tridimensional de los epítopos biológicos que lleva como sustituyentes. De esta forma, las biosondas fluorescentes basadas en materiales POSS estructuralmente bien definidos ofrecen unas ventajas muy interesantes sobre otras sondas más convencionales, como los análogos completamente orgánicos o nanopartículas híbridas estructuralmente heterogéneas y pueden convertirse en herramientas poderosas para estudiar las interacciones celulares a nivel molecular y para futuras aplicaciones biomédicas.

## **4.4 Parte Experimental**

### **4.4.1 Materiales y métodos:**

Además de los materiales y métodos generales descritos en el Capítulo 3, se emplearon los siguientes:

La purificación y separación de los compuestos de mayor tamaño y polaridad se realizó mediante cromatografía de filtración sobre gel con Sephadex® lipofílica LH-20 con un tamaño de lecho de 25-100  $\mu\text{m}$  (*Sigma-Aldrich*). El eluyente empleado se indica en cada caso y las proporciones de disolvente están expresadas en volumen/volumen.

Para las filtraciones, se empleó *Celita*® -545 de la casa comercial *SDS* o filtros de Nylon con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

### **A Caracterización de Glicodendrimeros**

Además de las técnicas habituales de caracterización (espectroscopía y espectrometría) descritas en el capítulo anterior se emplearon:

#### **A.1 Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)**

Los espectros de IR se realizaron en un microscopio IR Perkin Elmer *i-Series IMAGE* acoplado a un interferómetro *System 2000 GX*. Se empleó un objetivo de reflectancia total atenuada (ATR) con un cristal de germanio (cuyo índice de refracción  $n = 4$ ) con un diámetro de contacto de 100  $\mu\text{m}$ . Para obtener los espectros se presionó directamente el cristal de ATR sobre la muestra, se acumularon 40 barridos con una resolución espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **A.2 Cromatografía de exclusión de tamaños o permeación en gel (GPC).**

Los análisis de cromatografía de permeación en gel fueron llevados a cabo con columnas de Polymer Lab® rellenas con PL-Gel (300\*7.8 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño nominal de partícula). Se empleó THF como disolvente a 35 °C y a un flujo medio de 1 mL/min empleando un detector de infrarrojos. El peso molecular del calibrado de referencia se realizó con estándares de poliestireno PS.

## **B Estudios de interacción de los Glicodendrímeros.**

### **B.1 Técnicas biofísicas empleadas en el estudio de la interacción multivalente:**

#### ***Resonancia de Plasmón de Superficie SPR***

Los experimentos de SPR se realizaron en un equipo *Biacore T100* y los datos resultantes se analizaron con el programa *Biacore T100 Evaluation Software 2.0.4*. Para la inmovilización de la lectina Con A se realizó el equilibrado del chip sensor (CM5) con el tampón HEPES (pH = 7.4). La superficie de dextrano carboximetilado del chip se activó con un pulso de 5 min de una disolución 1:1 de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) 0.1 M y *N*-etil-*N'*-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) 0.1 M con una velocidad de flujo de 5  $\mu$ L/min. En el canal 1 se inmovilizó como control negativo TSST-1 (toxina del síndrome del shock tóxico) que no une D-manosa (2500 RU). La Con A a una concentración 80  $\mu$ g/mL en un tampón NaOAc/AcOH 10 mM (pH = 4.3), se inyectó en el canal 2 consiguiendo una inmovilización de 2600 RU. Para bloquear los esteres no reactivos se inyectó una disolución 1 M de etanolamina a pH = 8.5 durante 3 min. Todos los experimentos se realizaron a una velocidad de flujo de 30  $\mu$ L/min usando como eluyente el tampón 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> a pH = 7.4. La inyección del ligando fue de 120 s, seguido de una fase de disociación de 300 s. La regeneración se llevó a cabo con un pulso de 30 s de glicina·HCl (pH = 2.55). Para calcular los parámetros termodinámicos, cada uno de los ligandos se diluyó en el tampón a diferentes concentraciones: 125.00, 62.50, 31.25, 15.62, 7.81 y 3.90 nM. La temperatura a la que se realizaron estos experimentos fue de 25 °C.

#### ***Experimentos de ITC***

Los experimentos de calorimetría se realizaron en un calorímetro *MicroCal iTC200* (GE Healthcare). Se llevaron a cabo valoraciones individuales en las que se inyectó 2  $\mu$ L de los derivados de D-manosa de forma controlada con una microjeringa de 140  $\mu$ L a un intervalo de 1 min a una disolución de Con A, disuelta en el mismo tampón que en el ligando (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> a pH = 7.4). El agitador de la microjeringa de inyección estaba regulado a 240 rpm. Las dos primeras inyecciones se despreciaron con el fin de eliminar el efecto de la difusión de valorante a través de la punta de la jeringa durante el proceso de equilibrado. La temperatura a la que se realizaron estos ensayos fue de 25 °C. Los experimentos se ajustaron a un modelo de un sitio de unión y se obtuvieron los parámetros  $\Delta H$ ,  $K_A$  y  $n$  (número de sitios de unión). La concentración de Con A se determinó espectrofotométricamente a 280 nm usando el coeficiente de absorción molar de 108493

$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a  $\text{pH} = 7.4$  teniendo en cuenta que a ese  $\text{pH}$  la proteína es un tetrámero. Se realizaron dos experimentos control, uno de ellos consistente en la inyección del tampón utilizado a una disolución de Con A a la concentración empleada y el otro en la inyección del derivado de D-manosa correspondiente a una disolución de tampón. Estas curvas control se restaron a los experimentos. Todos los experimentos se han hecho al menos por duplicado para confirmar su reproducibilidad.

#### ***Anisotropía de Fluorescencia (FA)***

Los medidas de anisotropía se llevaron a cabo en un equipo *POLARStar* con software *FLUOstar Galaxy versión 4.11-0* (BMG, Offenburg, Alemania) excitando a 485 nm y recogiendo la emisión a 520 nm. Las muestras se prepararon en placas de 96 pocillos de poliestireno negro (Costar, Corning, NY) y (Nunc, Poskilde, Dinamarca). El volumen final empleado en los pocillos fue de 180  $\mu\text{L}$  o de 80  $\mu\text{L}$  respectivamente dependiendo de la placa empleada.

La ganancia del equipo se ajustó con un pocillo de referencia conteniendo fluoresceína disuelta en la misma disolución tampón en la que se realizó el experimento.

El tratamiento de datos y las gráficas se realizaron con el programa Prism4, GraphPad Software Inc.

#### **B.2 Técnicas microscópicas: Microscopía Confocal**

Los glico-POSS se disolvieron en DMSO a una concentración de 1 mM y se conservaron protegidos de la luz a 4 °C como disolución stock.

La línea celular empleada, células leucémicas humanas transfectadas establemente con K562 que expresan DC-SIGN,<sup>[63]</sup> fue cedida por el Prof. A. L. Corbi (CIB-CSIC, Madrid). Las células se mantuvieron de 5 a  $9 \times 10^5$  cel./mL en el medio RPMI 1640 (PAA) suplementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor, aminoácidos no esenciales, 2 mmol/L glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 pg/mL estreptomicina, y 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 (Invitrogen Life Technologies).

Las células se centrifugaron durante 5 min a 5 °C a 2000 rpm y se re-suspendieron en el tampón fosfato salino (PBS)  $\text{pH} 7.0$  con 1 mM  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de  $0.5 \times 10^6$  cel./mL. Posteriormente, se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de la disolución stock de los compuestos **36** ó **40** para alcanzar una concentración final de 1  $\mu\text{M}$ , y las células se incubaron protegidas de la luz durante 10 min a 4 °C con agitación suave. El exceso de compuesto no unido se eliminó



mediante 3 lavados consecutivos con PBS. El núcleo celular se tiñó a continuación específicamente con 4',6-diamidino-2-fenilindol.

Las imágenes se adquirieron con un objetivo de inmersión en aceite de  $\times 40$  aumentos en un microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS spectral.

#### **4.4.2 Síntesis de Glicodendrímeros**

##### **A Metodología general para las reacciones “click” de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino catalizadas por cobre(I) (CuAAC)**

De las condiciones de reacción CuAAC descritas en el capítulo anterior, se seleccionaron los métodos A y E para la preparación de los glico-POSS, según se indica en cada caso. Es importante señalar que la estequiometría empleada en este capítulo es diferente ya que en este caso se necesita funcionalizar homogéneamente todas las azidas del compuesto y no un número selectivo de ellas. La cantidad de alquino empleada con respecto a la de azida fue generalmente 10:1 mol-equiv considerando que un equivalente de POSS contiene 8 grupos azida (7 en el caso del compuesto funcionalizado con colorante en uno de sus vértices), por lo que el exceso de alquino empleado para cada grupo azida sería aproximadamente de 1.25: 1.

**Método A** (condiciones de Sharpless modificadas, con  $\text{CuSO}_4$ /ascorbato sódico): A una disolución del correspondiente alquino (10 eq.) disuelto en la mínima cantidad de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , bajo atmósfera de argón, se añadió la azida-POSS **6** o el **BDP-POSS 7** (1 eq.) seguido de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (0.5 eq.) y ascorbato sódico (2.5 eq.) predisoluertos en  $\text{H}_2\text{O}$  (mismo volumen que el de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Tras agitar la mezcla vigorosamente a t.a. hasta que se completó la reacción, se adicionó una disolución saturada de EDTA y se agitó durante media hora más para oxidar el cobre(I) a cobre(II) y complejarlo (fase acuosa de color azulado). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $2 \times 5 \text{ mL}$ ). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (s), se filtraron y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía flash sobre gel de sílice o por cromatografía de exclusión de tamaños sobre gel, según se indica en cada caso.

**Método B** (con  $[\text{Cu}(\text{C}_{18}\text{tren})]\text{Br}$ ): En un tubo de vidrio provisto de tapón de teflón para microondas se añadió una disolución del octaazido-POSS **6** o el **BDP-POSS 7** (1 eq.) y el alquino correspondiente (10 eq.) en tolueno, bajo atmósfera de argón. Se adicionaron  $[\text{Cu}(\text{C}_{18}\text{tren})]\text{Br}$  (0.5 eq.) y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (20 eq.) y la mezcla se irradió en un reactor de microondas focalizadas a  $80^\circ\text{C}$  durante el tiempo indicado en cada caso. El disolvente se

eliminó a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía flash sobre gel de sílice o por cromatografía de exclusión de tamaños sobre gel, según se indica en cada caso.

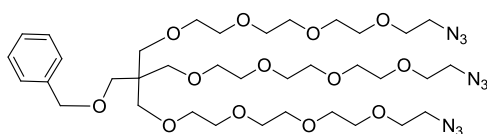
### B Metodología general para la desprotección de los grupos isopropiliden acetales

Se preparó una disolución (5-10 mM) del glicoPOSS correspondiente en ácido acético acuoso al 80% y se agitó vigorosamente durante 16-18 h. En los casos en los que la desprotección no fue completa, la mezcla de reacción se calentó a 38 °C durante 1-2 h, hasta que se observa por  $^1\text{H}$  RMN la desaparición completa de las señales de los grupos acetal. Posteriormente, se eliminó el disolvente a presión reducida a 20 °C o bien se liofilizó tras diluir con  $\text{H}_2\text{O}$ .

Se ensayaron otras metodologías de desprotección, pero condujeron a crudos de reacción menos limpios e incluso, en las condiciones más severas, a una ruptura parcial de la estructura de silsesquioxano por lo que se optó preferentemente por la desprotección con ácido acético acuoso a temperatura ambiente.

### C Síntesis de Glicodendrimeros de $\alpha$ -D-manosa simétricos

#### Compuesto 24



A una disolución de pentaeritritol monobencilado **23** (100 mg, 0.44 mmol) en DMF anhidra (5 mL) se adicionó NaH al 60% en parafina, (132 mg, 3.3 mmol). Tras agitar la suspensión durante 1 h, se añadió **22** (788.8 mg, 2.65 mmol) en DMF anhidra (2 mL) y la mezcla de reacción se calentó 12 horas a 60 °C. Posteriormente, se eliminó la DMF a presión reducida y el crudo resultante se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 50$  mL) y se extrajo con agua. La fase orgánica se lavó con disolución acuosa de NaCl saturada, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (s), se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna flash de gel de sílice empleando AcOEt para obtener el compuesto **24**, 190 mg (52%) como un aceite incoloro, y posteriormente con AcOEt/MeOH 10:1 para recuperar los productos secundarios de funcionalización parcial del POSS.

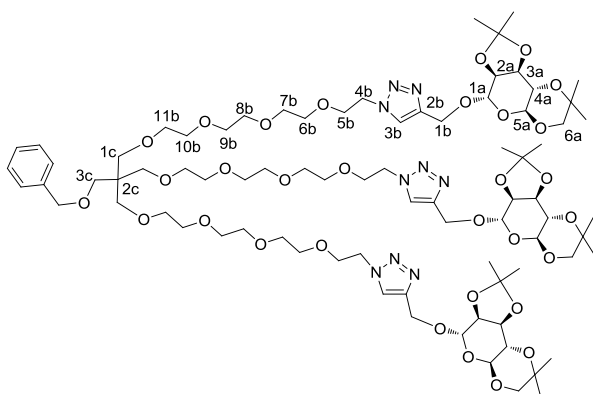
$R_f$  (AcOEt): 0.47

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.31 (t,  $J=5.1\text{Hz}$ , 6H, 3 x  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 3.40 (s, 8H, 4 x  $\text{CH}_2\text{C}$ ), 3.44-3.66 (m, 42H, 3 x  $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_3$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 4.40 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 7.14-7.31 (m, 5H, Ph).

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  45.7, 50.8 (3  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 69.5 ( $\text{BnOCH}_2\text{C}$ ), 70.1 (3  $\text{CH}_2\text{C}$ ), 70.2, 70.4, 70.7, 70.7, 70.8, 70.8, 71.1 ( $(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})_3$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 73.3 ( $\text{CH}_2\text{OPh}$ ), 127.3 (CH Ph), 128.3 (CH Ph), 138.9 (C Ph).

MS (API-ES): 830.5 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 852.5 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

### Compuesto 25



**Método A.** Sobre una disolución de la triazida **24** (101.3 mg, 0.122 mmol) y **14a** (138.2 mg, 0.463 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) se añadió una disolución acuosa (3 mL) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (10 mg, 0.035 mmol) y ascorbato sódico (91.7 mg, 0.463 mmol). Tras agitar la mezcla de reacción vigorosamente a t.a. durante 12 h, se adicionó una disolución saturada EDTA (2 mL) y se agitó una hora más para oxidar y complejar el cobre (fase acuosa azulada). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 10\text{ mL}$ ), el conjunto de fases orgánicas se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna empleando como eluyente AcOEt para recuperar el exceso de **14a** sin reaccionar y posteriormente con AcOEt/MeOH 15:1 para obtener el compuesto **25** como un aceite incoloro (164.4 mg, 78%).

$R_f$  (AcOEt/MeOH 10:1): 0.53

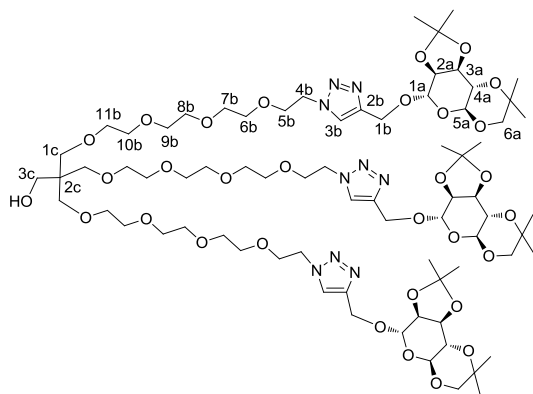
$[\alpha]_D^{20} = +0.115$  ( $c = 1.04$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.28 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.37 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.47 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.49 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 3.41(s, 6H, 3x CH<sub>2</sub> 1c), 3.42 (s, 2H, CH<sub>2</sub> 3c), 3.45-3.63 (m, 39H, 3 x (CH<sub>2</sub> 6b, CH<sub>2</sub> 7b, CH<sub>2</sub> 8b, CH<sub>2</sub> 9b, CH<sub>2</sub> 10b, CH<sub>2</sub> 11b y CH 5a), 3.66-3.78 (m, 6H, 3x CH 4a y 3 x CHH 6a), 3.79-3.87 (m, 6H, 3x CH 5b 3 x CHH 6a), 4.09 (dd,  $J_{H2a-H3a}$  = 5.6 Hz,  $J_{H3a-H4a}$  = 7.8 Hz, 3H, 3x CH 3a), 4.14 (d,  $J_{H2a-H3a}$  = 5.6 Hz, 3H, 3x CH 2a), 4.42 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph), 4.49 (t,  $J$  = 5.1Hz, 6H, 3x CH<sub>2</sub> 4b), 4.60 (d,  $J_{AB}$  = 12.3 Hz, 3H, 3x CHH1b), 4.76 (d,  $J_{AB}$  = 12.3 Hz, 3H, 3x CHH1b), 5.10 (s, 3H, 3x H1a), 7.15-7.31 (m, 5H, Ph), 7.70 (s, 3H, 3x CH 3b).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 18.8, 26.1, 28.2, 29.0 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 45.5 C(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, 50.2 CH<sub>2</sub> 4b, 60.4 CH<sub>2</sub>1b, 61.5, 62.0 CH 5a y CH<sub>2</sub> 6 a, 69.4 OCH<sub>2</sub> 5b, 70.1 CH<sub>2</sub>1c, 70.3 CH<sub>2</sub>3c, 70.4, 70.5, 70.5, 70.6, 70.6, 71.0 OCH<sub>2</sub> 6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b, 72.7 CH 4a, 73.2 CH<sub>2</sub>Ph, 74.8 CH 3a, 75.9 CH 2a, 97.0 CH 1a, 99.7 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 109.4 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 124.1 CH triazol 3b, 127.2, 127.3, 128.2 CH Ph, 143.5 C 2b.

**HRMS (ESI):** calculado para C<sub>81</sub>H<sub>129</sub>N<sub>9</sub>O<sub>31</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 863.4486, encontrado 863.4569, calculado para [M+H]<sup>+</sup> 1724.8867, encontrado 1724.8464, calculado para [M+Na]<sup>+</sup> 1746.8687, encontrado 1746.8171, calculado para [M+K]<sup>+</sup> 1762.8426, encontrado 1762.7886.

#### Compuesto 26



A un matraz conteniendo **25** (250 mg, 0.14 mmol) bajo atmósfera de argón, se adicionó Pd/C 10% (70 mg) seguido de AcOEt anhidro (3 mL) y la atmósfera del matraz se intercambió a H<sub>2</sub> a 1 atm de presión con la ayuda de un globo. Tras agitar durante 12 h a t.a., la mezcla se filtró con cuidado a través de un filtro de Nylon de 0.45 μM para eliminar el catalizador, y se evaporó el disolvente a presión reducida para obtener el compuesto **26** como un aceite incoloro (237 mg, 100%).

En aquellos casos en los que la reacción no fue completa, el crudo de reacción se filtró con un filtro de Nylon de 0.45  $\mu$ M, se eliminó el disolvente a presión reducida y se volvió a poner en las mismas condiciones hasta que se completó la reacción de desbencilación.

**R<sub>f</sub>** (AcOEt/MeOH 5:1): 0.47

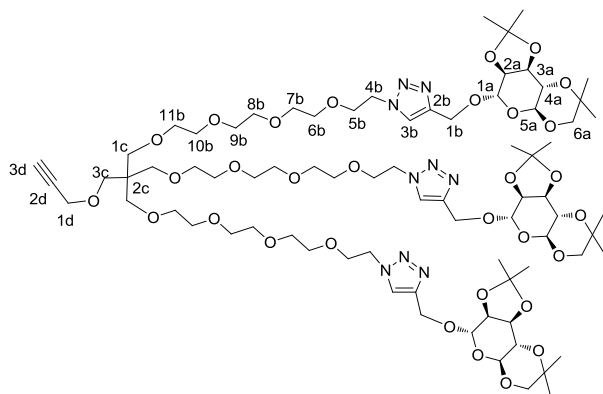
**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +11.40, CHCl<sub>3</sub>.

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, acetona-d<sub>6</sub>)  $\delta$  1.29 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.32 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.46 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.48 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 3.45 (s, 6H, 3x CH<sub>2</sub> 1c), 3.50-3.67 (m, 41H, 3 x (CH<sub>2</sub> 6b, CH<sub>2</sub> 7b, CH<sub>2</sub> 8b, CH<sub>2</sub> 9b, CH<sub>2</sub> 10b, CH<sub>2</sub> 11b, CH 5a y CH<sub>2</sub> 3c), 3.68-3.80 (m, 6H, 3x CH 4a y 3 x CHH 6a), 3.81-3.88 (m, 3H, 3 x CHH 6a), 3.91 (dd,  $J_{H5b-H5b'} = 4.7$  Hz,  $J_{H4b-H5b} = 5.5$  Hz, 6H, 3x CH<sub>2</sub> 5b), 4.01 (dd,  $J_{H2a-H3a} = 5.6$  Hz,  $J_{H3a-H4a} = 7.9$  Hz, 3H, 3x CH 3a), 4.13 (d,  $J_{H2a-H3a} = 5.6$  Hz, 3H, 3x CH 2a), 4.59 (dd,  $J_{H4b-H4b'} = 4.6$ ,  $J_{H4b-H5b} = 5.5$  Hz, 6H, 3x CH<sub>2</sub> 4b), 4.67 (d,  $J_{AB} = 12.0$  Hz, 3H, 3x CHH1b), 4.78 (d,  $J_{AB} = 12.0$  Hz, 3H, 3x CHH1b), 5.16 (s, 3H, 3x H1a), 8.05 (s, 3H, 3x CH 3b).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, acetona-d<sub>6</sub>)  $\delta$  19.2, 26.6, 28.5, 29.6 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 46.4 C(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, 50.8 CH<sub>2</sub> 4b, 61.0 CH<sub>2</sub>1b, 62.5, 62.6 CH 5a y CH<sub>2</sub> 6 a, 63.9 CH<sub>2</sub> 3c, 70.1 OCH<sub>2</sub> 5b, 71.0, 71.1, 71.2, 71.3, 71.4, 71.8 OCH<sub>2</sub> 6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b, 71.4 CH<sub>2</sub>1c, 73.7 CH 4a, 75.8 CH 3a, 76.9 CH 2a, 97.8 CH 1a, 100.1 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 109.7 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 125.4 CH triazol 3b, 144.3 C 2b.

**HRMS (ESI):** calculado para C<sub>74</sub>H<sub>125</sub>N<sub>9</sub>O<sub>31</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 817.9235, encontrado 817.9194, calculado para C<sub>74</sub>H<sub>123</sub>N<sub>9</sub>O<sub>31</sub> [M]<sup>+</sup> 1633.8283, encontrado 1633.8325

## Dendrón 28



A una disolución de **26** (200 mg, 0.122 mmol) en DMF anhidra (5 mL) se adicionó NaH en parafina al 60% (24.5 mg, 0.61 mmol). Tras agitar la mezcla a t.a. durante 1 h, se adicionó

gota a gota una disolución de bromuro de propargilo al 80% en tolueno (60  $\mu$ L, 0.54 mmol) y se dejó agitando a t.a. durante 48 h. Una vez completada la reacción, se adicionaron unas gotas de MeOH para destruir el exceso de bromuro de propargilo y NaH. Se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna empleando AcOEt/MeOH 10:1 para eliminar la parafina y posteriormente con AcOEt/MeOH 5:1 para obtener **28** (188 mg, 92%) como un aceite amarillo.

**R<sub>f</sub>** (AcOEt/MeOH 5:1): 0.59

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +16.73 (*c* = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).

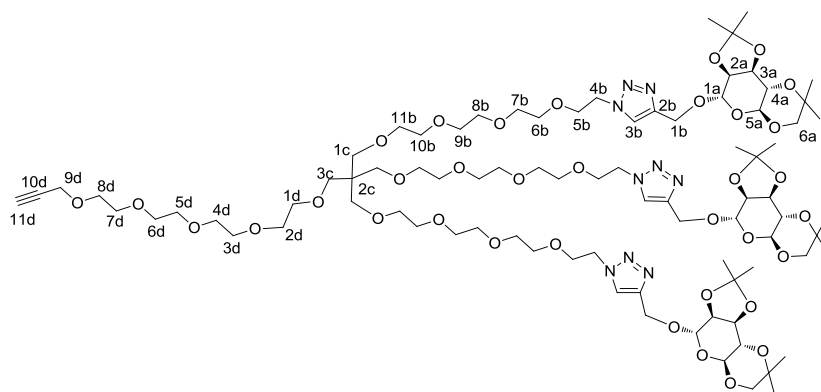
**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, acetona-d<sub>6</sub>)  $\delta$  1.29 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.32 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.46 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.48 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 3.42 (s, 6H, 3x CH<sub>2</sub> 1c), 3.49 (s, 2H, CH<sub>2</sub> 3c), 3.51-3.65 (m, 39H, 3 x (CH<sub>2</sub> 6b, CH<sub>2</sub> 7b, CH<sub>2</sub> 8b, CH<sub>2</sub> 9b, CH<sub>2</sub> 10b, CH<sub>2</sub> 11b y CH 5a), 3.69-3.78 (m, 6H, 3x CH 4a y 3 x CHH 6a), 3.81-3.87 (m, 3H, 3 x CHH 6a), 3.91 (dd,  $J_{H5b-H5b'} = 4.7$  Hz,  $J_{H4b-H5b} = 5.6$  Hz, 6H, 3x CH<sub>2</sub> 5b), 4.01 (dd,  $J_{H2a-H3a} = 5.6$  Hz,  $J_{H3a-H4a} = 7.9$  Hz, 3H, 3x CH 3a), 4.10-4.16 (m, 5H, 3x CH 2a y CH<sub>2</sub> 1d), 4.59 (dd,  $J_{H4b-H4b'} = 4.7$ ,  $J_{H4b-H5b} = 5.6$  Hz, 6H, 3x CH<sub>2</sub> 4b), 4.67 (d,  $J_{AB} = 12.1$  Hz, 3H, 3x CHH1b), 4.78 (d,  $J_{AB} = 12.1$  Hz, 3H, 3x CHH1b), 5.16 (s, 3H, 3x H1a), 8.05 (s, 3H, 3x CH 3b).

\*La señal CH del alquino no pudo ser asignada dado que se encontraba oculta bajo la señal residual de la acetona-d<sub>6</sub>.

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, acetona-d<sub>6</sub>)  $\delta$  19.1, 26.5, 28.4, 29.5 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 46.1 C(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, 50.6 CH<sub>2</sub> 4b, 60.9 CH<sub>2</sub>1d, 62.4 CH<sub>2</sub>1b, 62.4, 62.5 CH 5a y CH<sub>2</sub> 6a, 69.7 CH<sub>2</sub> 3c, 70.0 OCH<sub>2</sub> 5b, 70.5 CH<sub>2</sub> 1c, 70.9, 71.0, 71.1, 71.2, 71.3, 71.8 OCH<sub>2</sub> 6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b, 73.6 CH 4a, 75.7 CH 3a, 75.7 CH 3d, 76.8 CH 2a, 81.2 C 2d, 97.7 CH 1a, 100.0 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 109.6 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 125.2 CH triazol 3b, 144.2 C 2b.

**HRMS (ESI)**: calculado para C<sub>77</sub>H<sub>126</sub>N<sub>9</sub>O<sub>31</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1673.8554, encontrado 1672.8609, calculado para C<sub>77</sub>H<sub>127</sub>N<sub>9</sub>O<sub>31</sub> [M+2H]<sup>2+</sup> 836.9314, encontrado 836.9321, calculado para C<sub>77</sub>H<sub>125</sub>N<sub>9</sub>NaO<sub>31</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 1694.8374, encontrado 1694.8456.

## Dendrón 29



A una disolución de **26** (31 mg, 0.019 mmol) en THF anhidro (1 mL) en atmósfera inerte, se añadió NaH al 60% en parafina (9.1 mg, 0.228 mmol) y la mezcla se agitó durante 50 minutos a t.a. Transcurrido este tiempo, se adicionó una disolución de **27** (14.7 mg, 0.047 mmol) en THF anhidro (0.5 mL) y la mezcla se calentó a 50 °C durante 24 horas. Posteriormente, se adicionó otra porción de NaH (7 mg, 0.175 mmol) y se agitó a 50 °C durante 12 horas más. La mezcla de reacción se diluyó con Et<sub>2</sub>O (10 mL) y se lavó con agua (2 x 15 mL). La fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (2 x 10 mL) y el conjunto de fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna con AcOEt para aislar el compuesto **27** en exceso y posteriormente con AcOEt/MeOH 10:1 para obtener el dendrón **29** (24 mg, 68%) como un aceite incoloro.

**R<sub>f</sub>** (AcOEt/MeOH 5:1): 0.41

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +22.89 (*c* = 2.00, CHCl<sub>3</sub>).

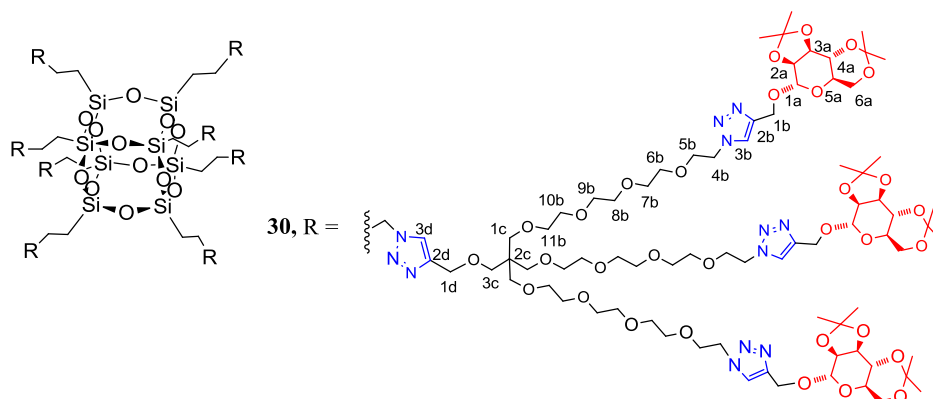
**<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.30 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.39 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.50 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 1.52 (s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub>C), 2.43 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH 11d), 3.39 (s, 8H, 3x CH<sub>2</sub> 1c y CH<sub>2</sub> 3c), 3.48 - 3.54 (m, 8H, OCH<sub>2</sub>), 3.54 - 3.69 (m, 47 H, 3x CH 5a y 22 x OCH<sub>2</sub>), 3.70 - 3.79 (m, 6H, 3x CH 4a y 3 x CHH 6a), 3.83 - 3.90 (m, 9H, 3 x CHH 6a y 3 x CH<sub>2</sub> 5b), 4.11 (dd, *J*<sub>H2a-H3a</sub> = 5.7 Hz, *J*<sub>H3a-H4a</sub> = 7.8 Hz, 3H, 3x CH 3a), 4.15-4.19 (m, 5H, 3x CH 2a y CH<sub>2</sub> 1d), 4.53 (t, *J*<sub>H4b-H5b</sub> = 5.1 Hz, 6H, 3x CH<sub>2</sub> 4b), 4.67 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.3 Hz, 3H, 3x CHH1b), 4.78 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.3 Hz, 3H, 3x CHH1b), 5.12 (s, 3H, 3x CH 1a), 7.72 (s, 3H, 3x CH 3b).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  18.9, 26.2, 28.3, 29.2  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , 45.6  $\text{C}(\text{CH}_2)_4$  2c, 50.4  $\text{CH}_2$  4b, 58.5  $\text{CH}_2$  9d, 60.5  $\text{CH}_2$  1b, 61.7, 62.1 CH 5a y  $\text{CH}_2$  6a, 69.2  $\text{OCH}_2$ , 69.5  $\text{OCH}_2$  5b, 69.9  $\text{CH}_2$  3c, 70.2  $\text{CH}_2$  1c, 70.5, 70.5, 70.5, 70.6, 70.6, 70.7, 70.7, 70.7, 71.1  $\text{OCH}_2$ , 72.8 CH 4a, 74.7 CH 11d, 74.9 CH 3a, 76.1 CH 2a, 79.8 C 10d, 97.1 CH 1a, 99.8  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , 109.5  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , 124.1 CH triazol 3b, 143.7 C 2b.

**HRMS (ESI):** calculado para  $\text{C}_{85}\text{H}_{142}\text{N}_9\text{O}_{35}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1848.9603, encontrado 1848.9749, calculado para  $\text{C}_{85}\text{H}_{143}\text{N}_9\text{O}_{35}$   $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  925.4854, encontrado 925.4849.

Siguiendo los procedimientos descritos anteriormente por nuestro grupo<sup>[59e]</sup> para la preparación de derivados de POSS octafuncionalizados mediante reacción CuAAC (métodos A y B), se sintetizaron los siguientes compuestos:

### Dendrúmero 30



**Método B.** En un tubo de vidrio para microondas provisto con tapón de teflón se introdujo bajo atmósfera de argón una disolución de azida-POSS **6** (10 mg, 9.18  $\mu\text{mol}$ ), el dendrón **28** (154 mg, 0.092 mmol), el catalizador Cu-tren (8.3 mg, 4.6  $\mu\text{mol}$ ) y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (33  $\mu\text{L}$ , 0.189 mmol) en tolueno (2 mL). La mezcla de reacción se calentó en un reactor de microondas focalizadas a 80  $^\circ\text{C}$  durante 6 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo resultante se purificó por cromatografía de exclusión de tamaños empleando Sephadex<sup>®</sup>-LH20 (previamente hinchada durante 3 h a t.a. en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:10) en una columna de 30 cm de alto y  $\varnothing$  1.5 cm a una velocidad de elución de 1 gota/3 seg. Se obtuvieron en primer lugar las fracciones correspondientes al POSS octasustituido puro **30** (62 mg, 47%), seguido de algunas fracciones de productos de funcionalización parcial y finalmente el compuesto **28** en exceso junto con el catalizador Cu-tren.



$[\alpha]_D^{20} = -0.58$  ( $c = 3.69$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz, acetona- $d_6$ ):  $\delta$  0.70 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Si}$ ), 1.29 (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.32 (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.46 (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.48 (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.96-2.12 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Si}$ ), 3.42 (s, 6H, 3x  $\text{CH}_2$  1c), 3.46-3.67 (m, 41H, 3 x ( $\text{CH}_2$  6b,  $\text{CH}_2$  7b,  $\text{CH}_2$  8b,  $\text{CH}_2$  9b,  $\text{CH}_2$  10b,  $\text{CH}_2$  11b,  $\text{CH}$  5a y  $\text{CH}_2$  3c), 3.68-3.80 (m, 6H, 3x  $\text{CH}$  4a y 3 x  $\text{CHH}$  6a), 3.85 (dd,  $J_{\text{H5-H6}} = 5.6$  Hz  $J_{\text{H6aH6a'}} = 10.6$  Hz, 3H, 3 x  $\text{CHH}$  6a), 3.91 (t,  $J_{\text{H4b-H5b}} = 5.0$  Hz, 6H, 3x  $\text{CH}_2$  5b), 4.01 (m, 3H, 3x  $\text{CH}$  3a), 4.13 (d,  $J_{\text{H2a-H3a}} = 5.6$  Hz, 3H, 3x  $\text{CH}$  2a), 4.40 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ) 4.53-4.63 (m, 8H, 3 x  $\text{CH}_2$  4b y  $\text{CH}_2$  1d), 4.67 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.2$  Hz, 3H, 3x  $\text{CHH1b}$ ), 4.79 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.2$  Hz, 3H, 3x  $\text{CHH1b}$ ), 5.17 (s, 3H, 3x  $\text{H1a}$ ), 7.99 (s, 1H,  $\text{CH}$  triazol 3d) 8.06 (s, 3H, 3x  $\text{CH}$  triazol 3b).

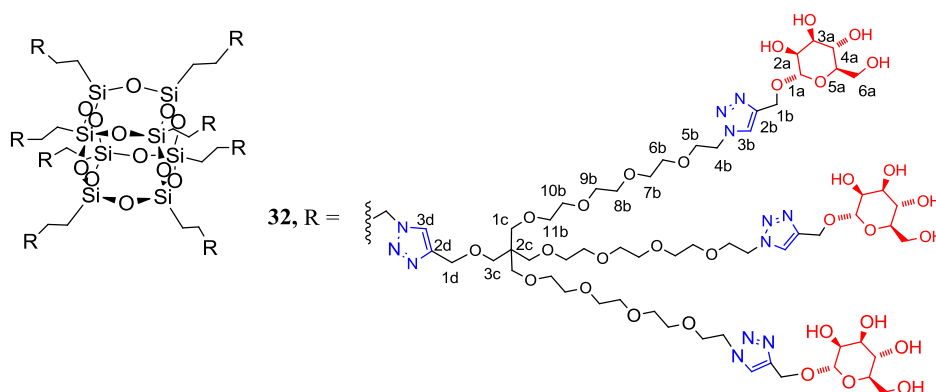
$^{13}\text{C RMN}$  (100 MHz, acetona- $d_6$ ):  $\delta$  9.3 ( $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 19.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 26.6  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , 28.5  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , 29.6  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , 46.6  $\text{C}(\text{CH}_2)_4$ , 50.7  $\text{CH}_2$  4b, 52.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 60.9 ( $\text{CH}_2\text{1b}$ ), 62.4, 62.5 ( $\text{CH}$  5a y  $\text{CH}_2$  6a), 65.7 ( $\text{CH}_2\text{1d}$ ), 70.0 ( $\text{OCH}_2$  5b), 70.5 ( $\text{CH}_2$  1c y 3c), 71.0, 71.0, 71.1, 71.2, 71.3, 71.8 ( $\text{OCH}_2$  6b, 7b, 8b, 9b, 10b y 11b), 73.6 ( $\text{CH}$  4a), 75.7 ( $\text{CH}$  3a), 76.8 ( $\text{CH}$  2a), 97.7 ( $\text{CH}$  1a), 100.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 109.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 124.2 ( $\text{CH}$  triazol 3d), 125.2 ( $\text{CH}$  triazol 3b), 144.2 ( $\text{C}$  2b), 145.8 ( $\text{C}$  2d).

$^{29}\text{Si RMN}$  (79.5MHz, acetona- $d_6$ ):  $\delta$  -66.09.

**MALDI-TOF** (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico)  $m/z$ : 14495  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2988, 1734, 1475, 1375, 1243, 1083 ( $\nu_{\text{Si-O-Si}}$ ), 1047, 852.

### Dendrímero 32



Siguiendo el procedimiento general de desprotección indicado más arriba, se disolvió el compuesto **30** (28 mg, 1.935  $\mu\text{mol}$ ) en AcOH acuoso al 80% (1 mL) y la disolución se agitó a

temperatura ambiente durante 72 h. El crudo de reacción se diluyó con agua (1 mL) y se liofilizó para obtener el dendrímero **32**.

**$^1\text{H}$  RMN** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0.49 – 0.74 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Si}$ ), 1.82-2.03 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Si}$ ), 3.35-3.79 (m, 56 H, 3x  $\text{CH}_3\text{a}$ , 3x  $\text{CH}_4\text{a}$ , 3x  $\text{CH}_5\text{a}$ , 3x  $\text{CH}_6\text{a}$ , 3x  $\text{CH}_2\text{1c}$ ,  $\text{CH}_2\text{3c}$  y 3 x ( $\text{CH}_2\text{6b}$ ,  $\text{CH}_2\text{7b}$ ,  $\text{CH}_2\text{8b}$ ,  $\text{CH}_2\text{9b}$ ,  $\text{CH}_2\text{10b}$ ,  $\text{CH}_2\text{11b}$ )), 3.79-3.87 (m, 6H, 3x  $\text{CH2a}$  y 3x  $\text{CH6a}$ ), 3.90 (t,  $J_{\text{H4b-H5b}} = 4.6$  Hz, 6H, 3x  $\text{CH}_2\text{5b}$ ), 4.20-4.30 (m, 1H,  $\text{CHH1d}$ ), 4.30-4.48 (m, 3H,  $\text{CHH1d}$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 4.49-4.68 (m, 9H, 3x  $\text{CH}_2\text{4b}$  y 3x  $\text{CHH1b}$ ), 4.68-4.85 (m, 3H, 3x  $\text{CHH1b}$ ), 4.89 (s, 3H, 3x  $\text{H1a}$ ), 8.03 (s, 1H,  $\text{CH triazol 3d}$ ), 8.10 (s, 3H, 3x  $\text{CH triazol 3b}$ ).

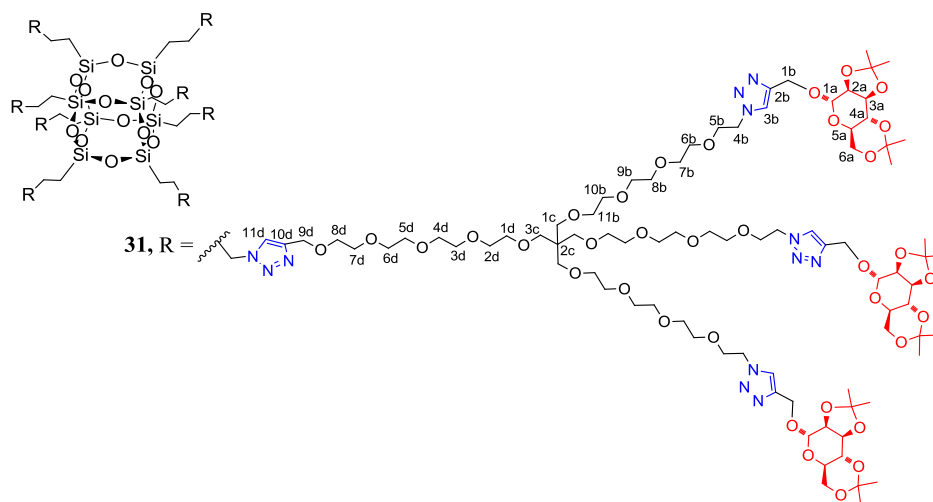
**$^{13}\text{C}$  RMN** (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  8.0 ( $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 23.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 45.3  $\text{C}(\text{CH}_2)_4$ , 50.1 ( $\text{CH}_2\text{4b}$ ), 53.8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 59.4 ( $\text{CH}_2\text{1b}$ ), 61.2 ( $\text{CH}_2\text{6a}$ ), 63.7 ( $\text{CH}_2\text{1d}$ ), 67.0 ( $\text{CH4a}$ ), 68.9 ( $\text{OCH}_2\text{5b}$ ), 69.0, 69.5, 69.9, 69.9, 69.9, 70.0, 70.0, 70.4 ( $\text{CH}_2\text{1c}$  y  $\text{3c}$  y  $\text{OCH}_2\text{6b}$ ,  $\text{7b}$ ,  $\text{8b}$ ,  $\text{9b}$ ,  $\text{10b}$  y  $\text{11b}$ ), 70.7 ( $\text{CH2a}$ ), 71.0 ( $\text{CH3a}$ ), 73.3 ( $\text{CH5a}$ ), 99.3 ( $\text{CH1a}$ ), 125.2 ( $\text{CH triazol 3b}$ ), 128.0 ( $\text{CH triazol 3d}$ ), 143.8 ( $\text{C2b}$  y  $\text{C2d}$ ).

**$^{29}\text{Si}$  RMN** (79.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  -66.87.

**MALDI-TOF** (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: Calculado 12572 encontrada banda ancha centrada en 12718.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3368, 2925, 2877, 1637, 1454, 1353, 1241, 1055 ( $\nu_{\text{st}}$  Si-O-Si), 808, 675, 615.

### Dendrímero 31



**Método B.** En un tubo de vidrio para microondas provisto con tapón de teflón se introdujo, bajo atmósfera de argón una disolución de azida POSS **6** (6 mg, 5.51  $\mu$ mol), **29** (102 mg, 0.055 mmol), el catalizador Cu-tren (5 mg, 2.8  $\mu$ mol) y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (19.2  $\mu$ L, 0.110 mmol) en tolueno (1.5 mL) junto con. El crudo de reacción se calentó en un reactor de microondas focalizadas a 80 °C durante 14 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el crudo por cromatografía de exclusión sobre gel empleando Sephadex<sup>®</sup>-LH20 (previamente hinchada durante 3 h a t.a. en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:10) con una columna de 30 cm de alto y  $\varnothing$  1.5 cm a una velocidad de elución de 1 gota/3 seg. Se obtuvieron en primer lugar las fracciones correspondientes al POSS octasustituido puro **31** (64 mg, 73%), seguido de algunas fracciones de funcionalización parcial y en último lugar el compuesto **29** en exceso junto con el catalizador Cu-tren.

$[\alpha]_D^{20} = +11.99$  ( $c = 2.20$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**$^1\text{H}$  RMN** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ )  $\delta$  0.52-0.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 1.31 (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.40 (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.51 (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.53 (s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.91-2.05 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 3.40 (s, 8H, 3x  $\text{CH}_2$  1c y  $\text{CH}_2$  3c), 3.49 - 3.54 (m, 8H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.54 - 3.71 (m, 47 H, 3x  $\text{CH}$  5a y 22 x  $\text{OCH}_2$ ), 3.71 - 3.80 (m, 6H, 3x  $\text{CH}$  4a y 3 x  $\text{CHH}$  6a), 3.83 - 3.92 (m, 9H, 3 x  $\text{CHH}$  6a y 3 x  $\text{CH}_2$  5b), 4.12 (dd,  $J_{\text{H}2\text{a}-\text{H}3\text{a}} = 5.5$  Hz,  $J_{\text{H}3\text{a}-\text{H}4\text{a}} = 7.8$  Hz, 3H, 3x  $\text{CH}$  3a), 4.18 (d,  $J_{\text{H}3\text{a}-\text{H}2\text{a}} = 5.5$  Hz, 3H,  $\text{CH}$  2a), 4.25-4.35 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 4.54 (t,  $J_{\text{H}4\text{b}-\text{H}5\text{b}} = 4.9$  Hz, 6H, 3x  $\text{CH}_2$  4b), 4.64 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.1$  Hz, 5H, 3x  $\text{CHH}$  1b y  $\text{CH}_2$  9d), 4.79 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.1$  Hz, 3H, 3x  $\text{CHH}$  1b), 5.13 (s, 3H, 3x  $\text{CH}$  1a), 7.66 (s, 3H, 3x  $\text{CH}$  3b), 7.74(s, 1H, 3x  $\text{CH}$  11d).

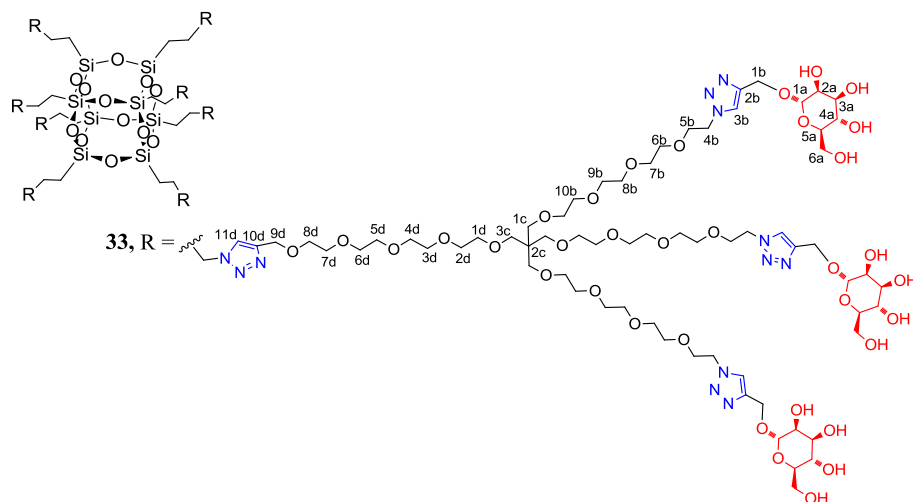
**$^{13}\text{C}$  RMN** (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.8 ( $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 18.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 26.2, 28.3, 29.2  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ , 45.6 ( $\text{C}(\text{CH}_2)_4$  2c), 50.4 ( $\text{CH}_2$  4b), 52.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 60.5 ( $\text{CH}_2$  1b), 61.7, 62.1 ( $\text{CH}$  5a y  $\text{CH}_2$  6a), 64.7 ( $\text{CH}_2$  9d), 69.5 ( $\text{OCH}_2$  5b), 69.8 ( $\text{CH}_2$  3c), 70.1( $\text{CH}_2$  1c), 70.4, 70.4, 70.6, 70.7, 70.7, 71.0, 71.0 ( $\text{OCH}_2$ ), 72.8 ( $\text{CH}$  4a), 74.9 ( $\text{CH}$  3a), 76.0 ( $\text{CH}$  2a), 97.1 ( $\text{CH}$  1a), 99.8 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 109.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 123.2 ( $\text{CH}$  triazol 11d), 124.1 ( $\text{CH}$  triazol 3b), 143.6 ( $\text{C}$  2b), 144.9 ( $\text{C}$  10d).

**$^{29}\text{Si}$  RMN** (79.5MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -67.38.

**MALDI-TOF** (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: Calculado 15801.9, encontrada banda centrada en 15895.

**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2872, 1734, 1462, 1369, 1246, 1085 ( $\nu_{\text{st}}$  Si-O-Si), 857.

### Dendrímero 33



Seguendo el procedimiento general de desprotección se disolvió el compuesto **31** (25 mg, 1.57  $\mu$ mol) en ácido acético acuoso al 80% (1 mL) y la disolución se agitó durante 24 h a temperatura ambiente y 3 h a 45 °C para completar la reacción ya que se observó por  $^1\text{H}$  RMN que la desprotección no había sido completa. El crudo de reacción se diluyó con agua (1 mL) y se liofilizó para dar el compuesto **33**.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  0.58-0.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 1.93-2.02 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 3.42 (s, 8H, 3x  $\text{CH}_2$  1c y  $\text{CH}_2$  3c), 3.50-3.56 (m, 8H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.56 - 3.68 (m, 50H, 3x  $\text{CH}$  5a, 3x  $\text{CH}$  4a y 22 x  $\text{OCH}_2$ ), 3.68-3.76 (m, 5H, 3x  $\text{CH}$  3a y 3 x  $\text{CHH}$  6a), 3.77-3.82 (m, 3H, 3x  $\text{CH}$  2a), 3.85 (dd,  $J_{\text{H}6\text{a}-5\text{a}} = 2.2$  Hz,  $J_{\text{H}6\text{a}-6\text{a}'} = 11.9$  Hz, 3H, 3 x  $\text{CHH}$  6a), 3.90 (t,  $J_{\text{H}4\text{b}-\text{H}5\text{b}} = 5.0$  Hz, 6H, 3x  $\text{CH}_2$  4b), 4.39 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$   $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 4.59 (t,  $J_{\text{H}5\text{b}-\text{H}4\text{b}} = 5.0$  Hz, 6H, 3 x  $\text{CH}_2$  5b), 4.65 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.4$  Hz, 5H, 3x  $\text{CHH}$  1b y  $\text{CH}_2$  9d), 4.80 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.4$  Hz, 3H, 3x  $\text{CHH}$  1b), 4.87 (s, 3H, 3x  $\text{CH}$  1a), 8.01 (s, 1H, 3x  $\text{CH}$  11d), 8.09 (s, 3H, 3x  $\text{CH}$  3b).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  9.4 ( $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 25.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 46.8 ( $\text{C}(\text{CH}_2)_4$  2c), 51.5 ( $\text{CH}_2$  4b), 53.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 60.8 ( $\text{CH}_2$  1b), 63.0 ( $\text{CH}_2$  6a), 65.1 ( $\text{CH}_2$  9d), 68.6 ( $\text{CH}$  4a), 70.4 ( $\text{OCH}_2$  5b), 70.9 ( $\text{CH}_2$  3c), 71.0 ( $\text{CH}_2$  1c), 71.5, 71.5, 71.5, 71.6, 71.6, 71.7, 72.0 ( $\text{OCH}_2$ ), 72.2 ( $\text{CH}$  2a), 72.6 ( $\text{CH}$  3a), 75.0 ( $\text{CH}$  5a), 100.8 ( $\text{CH}$  1a), 125.5 ( $\text{CH}$  triazol 11d), 126.3 ( $\text{CH}$  triazol 3b), 145.1 (C 2b, C 10d).

$^{29}\text{Si}$  RMN (HMBC,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  -69.91.

**MALDI-TOF** (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: Calculado para  $[\text{M}+\text{H}]^+$  14045, encontrado pico mayoritario a 14056.

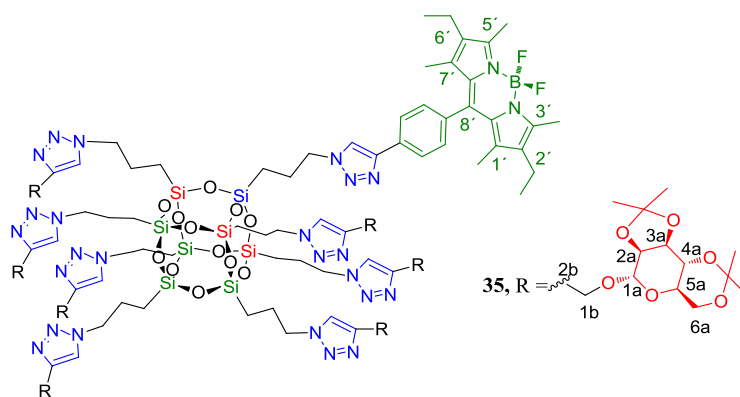
**IR** ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3342, 2873, 1648, 1562, 1455, 1350, 1250, 1054 ( $\nu_{\text{st}}$  Si-O-Si), 812, 667, 610.

### D Síntesis de glicodendrimeros de D-manosa marcados con sonda fluorescente BODIPY.

Empleando la estrategia sintética descrita en el capítulo anterior para la preparación de derivados heterobifuncionales, se utilizó el derivado monofuncionalizado de POSS con BODIPY (compuesto **7**) como producto de partida para la síntesis de nuevos glico-POSS etiquetados con una sonda fluorescente.

#### D.1 Derivados con 7 unidades de D-manosa con distinto espaciador

##### Compuesto **35**



**Método A.** A una disolución de POSS **7** (30 mg, 0.020 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.2 mL) se añadió el alquino **14a** (60 mg, 0.201 mmol) seguido de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (2.5 mg, 0.010 mmol) y ascorbato sódico (10 mg, 0.050 mmol) en agua (1.5 mL). Tras agitar 14 h a t.a., se adicionó una disolución saturada de EDTA (2 mL), se agitó durante 1 h y el crudo se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 5$  mL), se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante, se purificó por cromatografía flash en columna ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1) para obtener **35** como un aceite viscoso rojo (68 mg, 95%).

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10:1): 0.65

$[\alpha]_D^{20} = +32.21$  ( $c = 0.83$ , acetona)

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.66 (t, 14H, 7 x  $\text{Si}-\text{CH}_2$ ), 0.69-0.76 (m, 2H,  $\text{Si}^*\text{CH}_2$ ), 0.97 (t, 6H,  $^3J = 7.6$  Hz, 2 x  $\text{CH}_3-\text{CH}_2$ ), 1.34 (s, 6H,  $\text{CH}_3-\text{C}1'$ ,  $\text{CH}_3-\text{C}7'$ ), 1.35 (s, 21H, 7 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.42 (s, 21H, 7 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.51 (s, 21H, 7 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.54 (s, 21H, 7 x  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.95-2.11 (m, 16H, 7 x  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.29 (q, 4H,  $^3J = 7.6$  Hz, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.52 (s,

6H, 2 x  $\text{CH}_3\text{-C3}'$ , 2 x  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 3.54-3.65 (m, 7H, 7 x H-5a), 3.69-3.80 (m, 14H, 7 x H-6a, 7 x H-4a), 3.82-3.92 (m, 7H, 7 x H-6a'), 4.08-4.16 (m, 7H, 7 x H-3a), 4.19 (dd, 7H,  $^3J_{\text{H2a-H3a}} = 5.7$  Hz, 7 x H-2a), 4.29-4.38 (m, 14H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4.38-4.45 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}^*$ ), 4.64 (d,  $J_{\text{AB}} = 11.2$  Hz, 7H, 7 x H1b), 4.81 (d,  $J_{\text{AB}} = 11.2$  Hz, 7H, 7 x H1b'), 5.14 (s, 7H, 7 x H-1a), 7.35 (d, 2H,  $J_{\text{AB}} = 7.6$  Hz, 2 x CH fenilo), 7.71 (s, 4H, del 1,2,3-triazol), 7.72 (s, 3H, del 1,2,3-triazol), 8.00 (d, 2H,  $J_{\text{AB}} = 7.6$  Hz, 2 x CH fenilo), 8.15 (s, 1H, del 1,2,3-triazol\*).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.9 ( $\text{SiCH}_2$  y  $\text{Si}^*\text{CH}_2$ ), 12.1 ( $\text{CH}_3$  in  $\text{C1}'$ ,  $\text{C7}'$ ), 12.7 ( $\text{CH}_3$  in  $\text{C3}'$ ,  $\text{C5}'$ ), 14.8 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 18.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.1 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2$  y  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 26.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 29.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 52.4 ( $\text{CH}_2\text{-N=N}$ ), 52.6 ( $\text{CH}_2^*\text{-N=N}$ ), 60.5 ( $\text{C-1b}$ ), 61.9, 62.0 ( $\text{C-5a}$  y  $\text{C-6a}$ ), 72.7 ( $\text{C-4a}$ ), 74.9 ( $\text{C-3a}$ ), 76.0 ( $\text{C-2a}$ ), 96.5 ( $\text{C-1a}$ ), 99.8 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 109.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 120.8 (CH del 1,2,3-triazol), 123.5 (CH del 1,2,3-triazol\*), 126.3 (CH fenilo), 129.1 (CH fenilo), 130.8, 131.3, 132.9, 135.7, 138.3, 139.8, 143.8 (C en 1,2,3-triazol), 147.3 ( $\text{C}^*$  en 1,2,3-triazol), 154.0 ( $\text{C3}'$ ,  $\text{C5}'$ ).

$^{19}\text{F}$  RMN (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):  $\delta$  -146.65 a -146.15 (m, 2F).

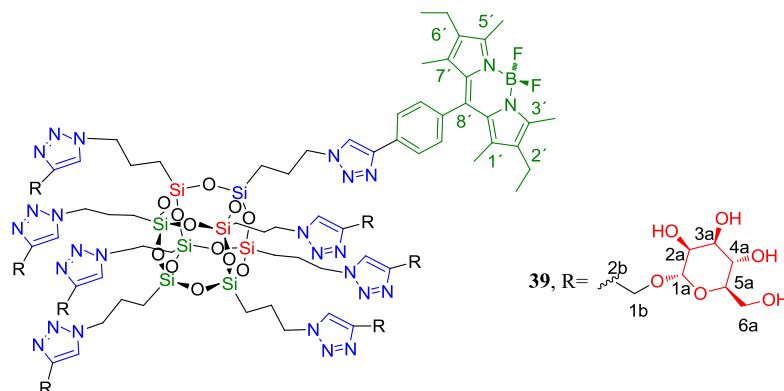
$^{29}\text{Si}$  RMN (79.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -67.31, -67.35.

UV/Vis (AcOEt):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 523 nm ( $5.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$\lambda_{\text{fluorescencia}}$  (AcOEt): 536 nm ( $\phi = 0.62$ ).

MALDI-TOF (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: 3604  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

### Compuesto 39



Siguiendo el procedimiento general de desprotección, se disolvió **35** (51 mg, 0.014 mol) en AcOH acuoso al 80% (1.5 mL) y se agitó 16 h a t.a. Posteriormente, tras diluir con agua, se eliminó el disolvente por liofilización para obtener **39** como un sólido rojo amorfo (42 mg, 98%).

Se observó por  $^1\text{H}$  RMN la presencia de algunos grupos protectores isopropiliden acetales residuales en posición 2a-3a. Sin embargo, por su mejor solubilidad en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , se utilizó la muestra parcialmente protegida para la caracterización del compuesto. Cuando el compuesto está totalmente desprotegido no es suficientemente soluble en MeOH y ellos nos impidió poder observar con claridad las señales de los carbonos cuaternarios del BODIPY. Al intentar disolverlo en agua, la formación de agregados, que se explicará con detalle en el último capítulo, se tradujo en un ensanchamiento excesivo de las señales del espectro de  $^1\text{H}$  NMR que dificultó su asignación (ver anexo).

Para completar la desprotección del compuesto, se procedió a disolver nuevamente el crudo anterior en AcOH acuoso al 80% (1.5 mL) y se agitó durante 3 h más a 35 °C hasta la total desaparición de señales de los grupos isopropiliden acetales en el espectro de  $^1\text{H}$  NMR. La muestra de reacción se diluyó con agua y se liofilizó obteniendo un sólido amorfo rojo.

**$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  0.52-0.69 (m, 14H, 7 x  $\text{Si-CH}_2$ ), 0.70-0.76 (m, 2H,  $\text{Si}^*\text{CH}_2$ ), 0.99 (t, 6H,  $^3J = 7.5$  Hz, 2 x  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.39 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-C1}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 1.89-2.11 (m, 16H, 7 x  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.34 (q, 4H,  $^3J = 7.5$  Hz, 2 x  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.48 (s, 6H, 2 x  $\text{CH}_3\text{-C3}'$ , 2 x  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 3.45-3.90 (m, 42H, 7 x H-4a, 7 x H-5a, 7 x H-3a, 7 x H-2a, 7 x H-6a, 7 x H-6a'), 4.39 (t,  $J = 5.9$  Hz, 14H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4.43 (m,  $J = 6.6$  Hz 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}^*$ ), 4.66 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.4$  Hz, 7H, 7 x H1b), 4.80 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.4$  Hz, 7H, 7 x H1b'), 4.86 (s, 7H, 7 x H-1a), 7.42 (d, 2H,  $J_{\text{AB}} = 8.2$  Hz, 2 x CH fenilo), 7.79-8.11 (m, 9H, 7 x 1,2,3-triazol, 2 x CH fenilo), 8.49 (s, 1H, del 1,2,3-triazol\*).

**$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  7.9 ( $\text{SiCH}_2$ ), 8.0 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2$ ), 10.9 ( $\text{CH}_3$  in  $\text{C1}'$ ,  $\text{C7}'$ ), 11.2 ( $\text{CH}_3$  in  $\text{C3}'$ ,  $\text{C5}'$ ), 13.6 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 16.4 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 23.6 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2$ ), 23.8 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 51.8 ( $\text{CH}_2\text{-N=N}$ ), 52.0 ( $\text{CH}_2^*\text{-N=N}$ ), 59.4 (C-1b), 61.6 (C-6a), 67.2, 70.6, 71.1, 73.6 (C-5a, C-4a, C-3a, C-2a), 99.4 (C-1a), 121.6 (CH del 1,2,3-triazol\*), 124.1 (CH del 1,2,3-triazol), 126.1 (CH fenilo), 128.9 (CH fenilo), 130.5, 131.3, 132.8, 135.4, 138.2, 140.1, 143.7 (C cuaternarios del BODIPY), 149.9 (C en 1,2,3-triazol), 146.6 (C\* en 1,2,3-triazol), 153.5 ( $\text{C3}'$ ,  $\text{C5}'$ ).

**$^{29}\text{Si}$  NMR (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ :** = -66.66, -66.62.

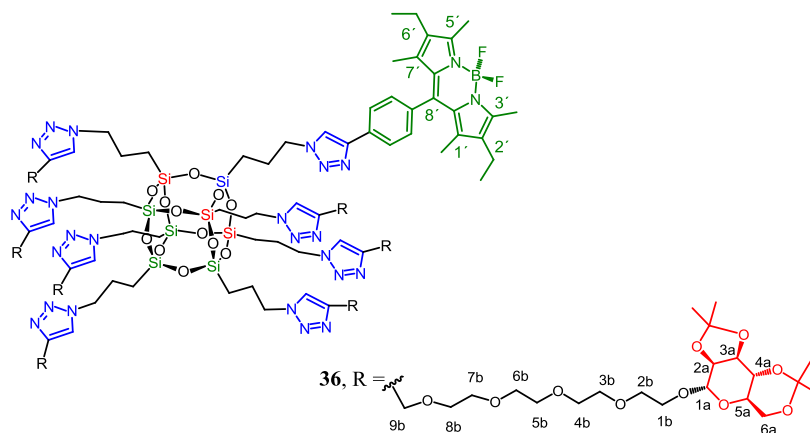
**UV/Vis (MeOH):**  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 523 nm ( $4.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

**$\lambda_{\text{fluorescencia}}$  (MeOH):** 538 nm ( $\phi = 0.33$ ).

**MALDI-TOF** (matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: calculado 3044  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  encontrado 3042.

**HRMS (ESI):** calculado para  $\text{C}_{112}\text{H}_{174}\text{N}_{26}\text{O}_{54}\text{Si}_8\text{BF}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  3021.9919, encontrado 3022.0107; calculado para  $\text{C}_{112}\text{H}_{175}\text{N}_{26}\text{O}_{54}\text{Si}_8\text{BF}_2$   $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  1511.4996, encontrado 1511.5031.

### Compuesto 36



**Método A:** A una disolución de **POSS 7** (40 mg, 0.027 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) se añadió el alquino **34** (127 mg, 0.268 mmol) seguido de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (3.3 mg, 0.013 mmol) y ascorbato sódico (13.3 mg, 0.067 mmol) en agua (1.5 mL). Tras agitar vigorosamente durante 20 h. a t.a., se adicionó una disolución acuosa saturada de EDTA (2 mL) y se continuó la agitación durante 30 min más. La mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL), las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía flash en columna (SiO<sub>2</sub>) usando primero CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1, para recuperar el exceso de **34** (44 mg, 39% calculado con respecto al 30% de exceso utilizado), seguido de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1 para obtener **36** como un aceite viscoso rojo (97 mg, 75%).

$$R_f = 0.63 \text{ (CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH 9:1)}.$$

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.55-0.65 (m, 14H, 7 x Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.65-0.73 (m, 2H, Si\*CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 0.97 (t, 6H, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2 x CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.32 (s, 27H, CH<sub>3</sub>-C1', CH<sub>3</sub>-C7', 7 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.40 (s, 21H, 7 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.50 (s, 21H, 7 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.52 (s, 21H, 7 x C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.88-2.11 (m, 16H, 7 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, Si\* CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.29 (q, 4H, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2 x CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.52 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-C3', 2 x CH<sub>3</sub>-C5'), 3.53-3.61 (m, 7H, 7 x H-5a), 3.58-3.68 (m, 105H, 7 x H1b, 7 x (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>OCH<sub>2</sub>), 3.68-3.76 (m, 14H, 7 x H-6a, 7 x H-4a), 3.75-3.81 (m, 7H, 7 x H1b), 3.81-3.87 (m, 7H, 7 x H-6a'), 4.13 (dd, 7H, <sup>3</sup>J<sub>H3a-H2a</sub> = 5.6 Hz <sup>3</sup>J<sub>H3a-H4a</sub> = 7.9 Hz, 7 x H-3a), 4.19 (dd, 7H, <sup>3</sup>J<sub>H2a-H3a</sub> = 5.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2a-H1a</sub> = 1.2 Hz, 7 x H-2a), 4.26-4.35 (m, 14H,



$\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4.37-4.44 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}^*$ ), 4.65 (bs, 14H, 7 x  $\text{CH}_2\text{-9b}$ ), 5.03 (d, 7H,  $^3J = 1.2$  Hz, 7 x H-1a), 7.33 (d, 2H,  $J_{\text{AB}} = 8.2$  Hz, 2 x CH fenilo), 7.65 (s, 4H, in 1,2,3-triazol), 7.66 (s, 3H, in 1,2,3-triazol), 8.01 (d, 2H,  $J_{\text{AB}} = 8.2$  Hz, 2 x CH fenilo), 8.20 (s, 1H, in 1,2,3-triazol\*).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.8 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 8.9 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 12.1 ( $\text{CH}_3$  in  $\text{C1}', \text{C7}'$ ), 12.6 ( $\text{CH}_3$  in  $\text{C3}', \text{C5}'$ ), 14.8 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 18.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.0 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2$ ), 24.2 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 26.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 29.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 52.3 ( $\text{CH}_2\text{-N=N}$ ), 52.6 ( $\text{CH}_2^*\text{-N=N}$ ), 61.4 (C-5a), 62.1 (C-6a), 64.7 (C-9b), 66.8 (C-1b), 69.9 (C-2b), 70.2 (C-8b), 70.6 y 70.7 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 72.8 (C-4a), 74.9 (C-3a), 76.1 (C-2a), 97.9 (C-1a), 99.8 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 109.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 123.2 (CH del 1,2,3-triazol), 126.3 (CH del 1,2,3-triazol\*), (129.0 (CH fenilo), 130.8, 131.4, 132.9, 135.5, 138.4, 139.9, 145.0 (C del 1,2,3-triazol), 147.1 (C\* del 1,2,3-triazol), 153.9 ( $\text{C3}', \text{C5}'$ ).

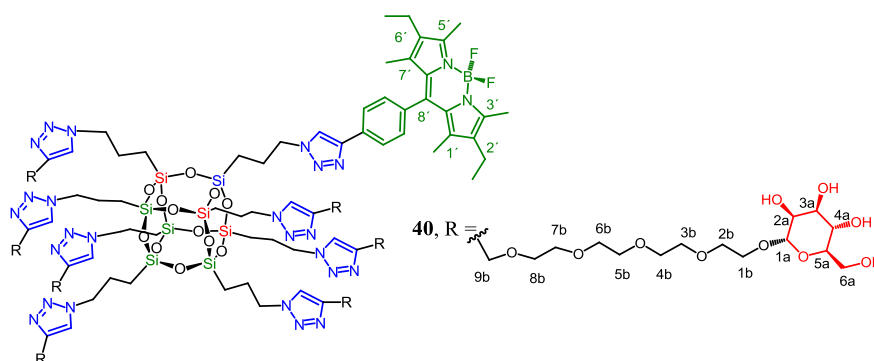
$^{29}\text{Si}$  RMN (79.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -67.33, -67.34, -67.36.

UV/Vis (AcOEt):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 523 nm ( $4.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$\lambda_{\text{fluorescencia}}$  (AcOEt): 536 nm ( $\phi = 0.74$ ).

MALDI-TOF (matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: 4837.5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

### Compuesto 40



Seguendo el procedimiento general de desprotección, se disolvió **36** (20 mg, 4.15  $\mu\text{mol}$ ) en ácido acético acuoso al 80% (1.5 mL) y se agitó 16 h a t.a. Se eliminó el disolvente a presión reducida para obtener **40** como un aceite rojo viscoso (17 mg, 100%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -1.46$  ( $c = 0.85$  (g/100mL),  $\text{CH}_3\text{OH}$ )

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0.51-0.69 (m, 14H,  $\text{Si-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 0.69-0.77 (m, 2H,  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.00 (t, 6H,  $^3J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 1.40 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-C1}', \text{CH}_3\text{-C7}'$ ), 1.88-2.10 (m, 16H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ,  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.36 (q, 4H,  $^3J = 7.5$  Hz  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.49 (s,

6H,  $\text{CH}_3\text{-C3}'$ ,  $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ), 3.51-3.71 (m, 133H, 7 x  $\text{H-5a}$ , 7 x  $\text{H-3a}$ , 7 x  $\text{H-4a}$ , 7 x  $\text{H-6a}$ , 7 x  $\text{H-1b}$ , 7 x  $\text{CH}_2\text{-2b}$ , 7 x  $\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{O}$ ), 3.76-3.82 (m, 21H, 7 x  $\text{H-6a}'$ , 7 x  $\text{H-2a}$ , 7 x  $\text{H-1b}$ ), 4.33-4.45 (m, 14H, 7 x  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 4.45-4.52 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}^*$ ), 4.64 (bs, 14H, 7 x  $\text{H-9b}$ ), 4.79 (bs, 7H, 7 x  $\text{H-1a}$ ), 7.44 (d, 2H,  $J_{\text{AB}} = 7.9 \text{ Hz}$ , 2 x  $\text{CH}$  fenilo), 7.90-8.17 (m, 9H, 7 x  $\text{H}$  del 1,2,3-triazol, 2 x  $\text{CH}$  fenilo), 8.54 (s, 1H, del 1,2,3-triazol\*).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  9.3 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ) y ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 12.3 ( $\text{CH}_3$  de  $\text{C1}'$ ,  $\text{C7}'$ ), 12.4 ( $\text{CH}_3$  de  $\text{C3}''$ ,  $\text{C5}''$ ), 15.1 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.9 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 25.2 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2$ ) 25.2 ( $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 53.2 ( $\text{CH}_2\text{-N=N}$ ) y ( $\text{CH}_2^*\text{-N=N}$ ), 63.0 ( $\text{C-6}$ ), 65.1 ( $\text{C-9}'$ ), 67.8 ( $\text{C-1}'$ ), 68.6 ( $\text{C-4}$ ), 71.5, 71.5, 71.6 y 71.6 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{O}$ ) y ( $\text{C-2}'$ ), 72.1 ( $\text{C-2}$ ), 72.6 ( $\text{C-3}$ ), 74.6 ( $\text{C-5}$ ), 101.7 ( $\text{C-1}$ ), 121.5 ( $\text{CH}$  del 1,2,3-triazol\*), 125.4 ( $\text{CH}$  del 1,2,3-triazol), 127.5 ( $\text{CH}$  fenilo), 130.4 ( $\text{CH}$  fenilo), 131.9 ( $\text{C7a}''$ ,  $\text{C8a}''$ ), 132.8, 134.2 ( $\text{C2}''$ ,  $\text{C6}''$ ), 136.9, 139.6 ( $\text{C1}''$ ,  $\text{C7}''$ ), 141.6, 145.9 ( $\text{C}$  del 1,2,3-triazol), 146.5 ( $\text{C}^*$  del 1,2,3-triazol), 155.0 ( $\text{C3}''$ ,  $\text{C5}''$ ).

$^{29}\text{Si}$  RMN (79.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  -66.78, -66.82.

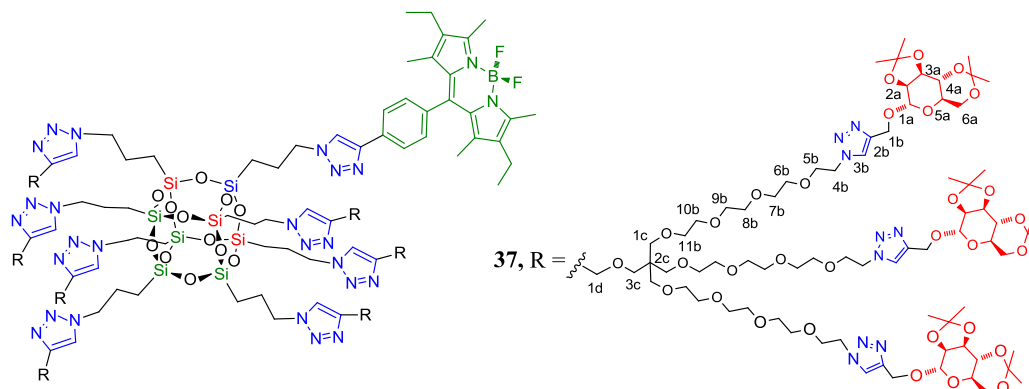
UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 523 nm ( $4.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

$\lambda_{\text{fluorescencia}}$  (MeOH): 538 nm ( $\phi = 0.42$ ).

MALDI-TOF (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: 4276.7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

## D.2 Derivados con 21 unidades de D-manosa con distinta longitud de espaciador

### Dendrímico 37



**Método B.** En un tubo de vidrio para microondas provisto con tapón de teflón, se introdujo bajo atmósfera de argón una disolución de **POSS 7** (8.3 mg, 5.56  $\mu\text{mol}$ ), **28** (93 mg, 0.056 mmol), el catalizador Cu-tren (5 mg, 2.8  $\mu\text{mol}$ ) y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (19  $\mu\text{L}$ , 0.110 mmol) en tolueno (2 mL). El crudo de reacción se calentó en un reactor de microondas focalizadas a 80  $^\circ\text{C}$  durante 8 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el crudo por

cromatografía de exclusión de tamaños empleando Sephadex®-LH20 (previamente hinchada durante 3 h a t.a. en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:10) con una columna de 30 cm de alto y  $\varnothing$  1.5 cm a una velocidad de elución de 1 gota/3 seg. Se obtuvieron en primer lugar las fracciones correspondientes al dendrímero **37** (42.5 mg, 58 %) como un aceite viscoso rojo, seguido fracciones de mezclas de productos de funcionalización parcial con el compuesto **28** en exceso y el catalizador Cu-tren en último lugar.

$$[\alpha]_D^{20} = +15.31 \text{ (} c = 0.79, \text{ acetona)}$$

**$^1\text{H}$  RMN** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):  $\delta$  0.54-0.74 (m, 16H,  $\text{CH}_2\text{-Si}$  y  $\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 0.97 (t,  $J = 7.5$  Hz, 6H,  $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.31 (s, 63H,  $(7 \times 3) \times \text{CH}_3\text{C}$ ), 1.33 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{C1' y C7'}$ ), 1.40 (s, 63H,  $(7 \times 3) \times \text{CH}_3\text{C}$ ), 1.50 (s, 63H,  $(7 \times 3) \times \text{CH}_3\text{C}$ ), 1.50 (s, 63H,  $(7 \times 3) \times \text{CH}_3\text{C}$ ), 1.93-2.11 (m, 16H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Si}$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Si}^*$ ), 2.29 (q,  $J = 7.5$  Hz, 4H,  $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 2.51 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{C3' y C5'}$ ), 3.40 (s, 42H,  $7 \times 3 \text{ CH}_2\text{1c}$ ), 3.46-3.67 (m, 287H,  $7 \times 3 \times (\text{CH}_2\text{6b, CH}_2\text{7b, CH}_2\text{8b, CH}_2\text{9b, CH}_2\text{10b, CH}_2\text{11b, CH5a y CH}_2\text{3c})$ ), 3.70-3.80 (m, 42H,  $7 \times 3 \times \text{CH4a y } 7 \times 3 \text{ CHH6a}$ ), 3.82-3.93 (m, 63H,  $3 \times 7 \text{ CHH6a' y CH}_2\text{5b}$ ), 4.11 (dd,  $J_{\text{H2a-H3a}} = 5.5$  Hz  $J_{\text{H4a-H3a}} = 7.9$  Hz, 21H,  $7 \times 3 \text{ CH3a}$ ), 4.17 (d,  $J_{\text{H2a-H3a}} = 5.6$  Hz, 21H,  $7 \times 3 \text{ CH2a}$ ), 4.24-4.36 (m, 14H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 4.36-4.45 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 4.47-4.59 (m, 49H,  $7 \times 3 \text{ CH}_2\text{4b y } 7 \times \text{CHH1d}$ ), 4.63 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.3$  Hz, 28H,  $7 \times 3 \text{ CHH1b y } 7 \times \text{CHH1d}$ ), 4.78 (d,  $J_{\text{AB}} = 12.3$  Hz, 21H,  $7 \times 3 \text{ CHH1b}$ ), 5.12 (s, 21H,  $7 \times 3 \text{ H1a}$ ), 7.33 (d,  $J_{\text{AB}} = 8.2$  Hz, 2H, fenilo), 7.49-7.95 (m, 27H, 2H fenilo,  $7 \times 3 \text{ CH triazol 3b y } 4 \times \text{CH triazol 3d}$ ), 8.01 (s, 3H,  $3 \times \text{CH triazol 3d}$ ) 8.27 (s, 1H,  $\text{CH triazol 13'}$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):  $\delta$  8.9 ( $\text{CH}_2\text{Si}$  y  $\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 12.1 ( $\text{CH}_3$  in  $\text{C1' y C7'}$ ), 12.7 ( $\text{CH}_3$  en  $\text{C3', C5'}$ ), 14.8 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 18.9 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 24.0 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 26.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 29.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.7 ( $\text{C}(\text{CH}_2)_4$ ), 50.4 ( $\text{CH}_2\text{4b}$ ), 52.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 60.5 ( $\text{CH}_2\text{1b}$ ), 61.7, 62.1 ( $\text{CH5a y CH}_2\text{6a}$ ), 65.2 ( $\text{CH}_2\text{1d}$ ), 69.5 ( $\text{OCH}_2\text{5b}$ ), 70.1 ( $\text{CH}_2\text{3c}$ ), 70.4, 70.6, 70.7, 70.7, 71.1, ( $\text{OCH}_2\text{6b, 7b, 8b, 9b, 10b y 11b}$ ), 72.8 ( $\text{CH4a}$ ), 74.9 ( $\text{CH3a}$ ), 76.1 ( $\text{CH2a}$ ), 97.2 ( $\text{CH1a}$ ), 99.8 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 109.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 121.1 ( $\text{CH triazol 13'}$ ), 123.1 ( $\text{CH fenilo}$ ), 124.2 ( $\text{CH triazol 3b}$ ), 126.3 ( $\text{CH triazol 3d}$ ), 129.0 ( $\text{CH fenilo}$ ), 130.8, 132.9, 135.5, 138.3, 139.9, 143.7, 145.5 ( $\text{C2b}$ ), 148.6 ( $\text{C2d}$ ), 153.8.

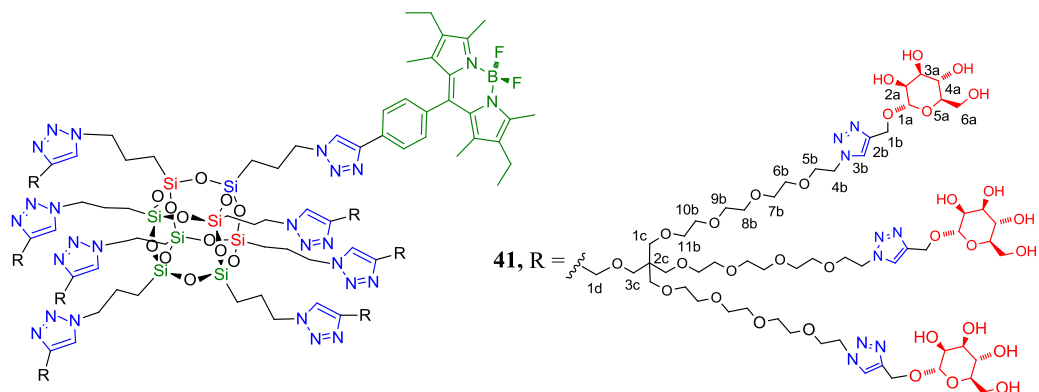
**$^{29}\text{Si}$  RMN** (79.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):  $\delta$  -67.37, -67.44.

**$^{19}\text{F}$  RMN** (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ )  $\delta$  -146.43 a -145.48 (m, 2F,  $\text{BF}_2$ ).

**UV/Vis** ( $\text{AcOEt}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 523 nm ( $6.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

**$\lambda_{\text{fluorescencia}}$**  ( $\text{AcOEt}$ ): 537 nm ( $\phi = 0.58$ ).

**MALDI-TOF** (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: Banda muy ancha centrada en 9558



Siguiendo el procedimiento general descrito para las desprotecciones, se disolvió **37** (50 mg, 3.77  $\mu$ mol) en AcOH acuoso al 80 % (1.5 mL) y se agitó a t.a. durante 30 h seguido de 2 h a 38 °C hasta completar la desprotección. Transcurrido este tiempo, se diluyó con agua y se eliminó el disolvente por liofilización para obtener **41** (36.5 mg, 84 %) como un aceite rojo muy viscoso.

**<sup>1</sup>H RMN** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 0.44-0.70 (m, 14H, CH<sub>2</sub>-Si), 0.70-0.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Si\*), 0.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H, 2x CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.39 (s, 6H, CH<sub>3</sub> C1'y C7'), 1.80-2.10 (m, 16H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Si y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-Si\*), 2.28-2.40 (m, 4H, 2x CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 2.49 (s, 6H, CH<sub>3</sub> C3'y C5'), 3.34-3.76 (m, 392H, 7x3 (CH<sub>2</sub> 1c, CH<sub>2</sub> 6b, CH<sub>2</sub> 7b, CH<sub>2</sub> 8b, CH<sub>2</sub> 9b, CH<sub>2</sub> 10b, CH<sub>2</sub> 11b, CH 5a, CH 4a, CHH 6a, CH 3a) y 7x CH<sub>2</sub> 3c), 3.79 (s.a. 21H, 7x3 CH 2a), 3.81-3.93 (m, 63H, 7x3 CHH 6a' y CH<sub>2</sub> 5b), 4.30-4.45 (m, 14H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 4.45-4.51 (m, 2H CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si\*), 4.51-4.61 (m, 49H, 7x3 CH<sub>2</sub> 4b y 7x CHH 1d), 4.61-4.68 (m, 28H, 7x3 CHH1b y 7x CHH 1d), 4.79 (d, *J*<sub>AB</sub> = 12.2 Hz, 21H, 7x3 CHH1b), 4.86 (s, 21H, 7x3 H1a), 7.44 (d, *J*<sub>AB</sub> = 7.2 Hz, 2H, fenilo), 7.94-8.28 (m, 30H, 2H fenilo, 7x3 CH triazol 3b y 7x CH triazol 3d), 8.55 (s, 1H, CH triazol 13').

**<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.0 (CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>Si\*), 13.0, 13.2 (CH<sub>3</sub> in C1', C7', C3', C5'), 14.1 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 17.0 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 23.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si\*), 45.4 (C(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>), 50.0 (CH<sub>2</sub> 4b), 51.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si\*), 59.3 (CH<sub>2</sub>1b), 61.6 (CH<sub>2</sub> 6a), 63.7 (CH<sub>2</sub>1d), 67.2 (CH 4a), 68.9 (OCH<sub>2</sub> 5b), 69.5 (CH<sub>2</sub> 3c y 1c), 70.0, 70.1, 70.2, 70.2, 70.8 (OCH<sub>2</sub> 6b, 7b, 8b, 9b, 10b y 11b), 70.6 (CH 2a), 71.1 (CH 3a), 73.6 (CH 5a), 99.4 (CH 1a), 123.8 (CH fenilo), 124.8 (CH triazol 3b), 126.2 (CH triazol 3d y 13'), 128.1 (CH fenilo), 130.5, 132.8, 136.0, 138.9, 142.3, 143.7 (C 2b), 144.9 (C 2d), 149.3, 152.5, 157.1.

$^{29}\text{Si}$  RMN (79.5MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  -61.65, -61.68

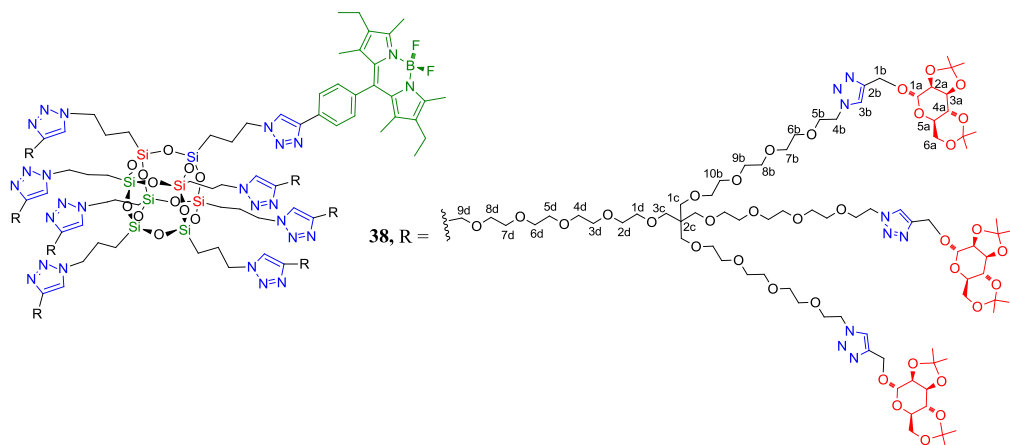
$^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  -146.75 a -145.80 (m, 2F,  $\text{BF}_2$ ).

UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 523 nm ( $5.4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$\lambda_{\text{fluorescencia}}$  (AcOEt): 538 nm ( $\phi$  = 0.45).

MALDI-TOF (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: Calculado 11514, encontrada banda muy ancha desde 6024 a 12612.

### Dendrímero 38



**Método B.** En un tubo de vidrio para microondas provisto con tapón de teflón se introdujo bajo en atmósfera de argón una disolución de **POSS 7** (7 mg, 4.69  $\mu\text{mol}$ ), el dendrón **29** (78 mg, 0.042 mmol), el catalizador Cu-tren (4.2 mg, 2.34  $\mu\text{mol}$ ) y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (16  $\mu\text{L}$ , 0.094 mmol) en tolueno (1.5 mL). El crudo de reacción se calentó en un reactor de microondas focalizadas a 80  $^\circ\text{C}$  durante 12 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purificó por cromatografía de exclusión de tamaños empleando Sephadex<sup>®</sup>-LH20 (previamente hinchada durante 3 h a t.a. en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:10) con una columna de 30 cm de alto y  $\varnothing$  1.5 cm a una velocidad de elución de 1 gota/3 seg. Se obtuvieron en primer lugar las fracciones correspondientes al dendrímero de POSS puro **38** (52 mg, 77 %) como un aceite rojo, seguido de fracciones de mezcla con el compuesto **29** en exceso y el catalizador Cu-tren en último lugar.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +12.54$  ( $c$  = 1.15, acetona).

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):  $\delta$  0.47-0.66 (m, 14H,  $\text{CH}_2\text{-Si}$ ), 0.66-0.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Si}^*$ ), 0.97 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 6H, 2x  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 1.31(s, 63H, (7x3) x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.33 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{C1}$  y  $\text{C7}$ ), 1.40

(s, 63H, (7x3) x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.50 (s, 63H, (7x3) x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.52 (s, 63H, (7x3) x  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 1.90-2.10 (m, 16H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Si}$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Si}^*$ ), 2.29 (q,  $J = 7.5$  Hz, 4H, 2x  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ), 2.51 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{C3'}$  y  $\text{C5'}$ ), 3.39 (s, 56H, 7x3  $\text{CH}_2$  1c y 7x  $\text{CH}_2$  3c), 3.48-3.70 (m, 385H, 7x3 ( $\text{CH}_2$  6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b,  $\text{CH}$  5a) y 7x ( $\text{CH}_2$  1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 8d)), 3.71-3.79 (m, 42H, 7x3 ( $\text{CH}$  4a y  $\text{CHH}$  6a)), 3.82-3.93 (m, 63H, 3x7  $\text{CHH}$  6a' y  $\text{CH}_2$  5b), 4.12 (d,  $J = 6.6$  Hz, 21H, 7x3  $\text{CH}$  3a), 4.15-4.23 (m, 21H, 7x3  $\text{CH}$  2a), 4.24-4.36 (m, 14H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 4.36-4.45 (m, 2H  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 4.48-4.59 (m, 42H, 7x3  $\text{CH}_2$  4b), 4.59-4.70 (m, 35H, 7x3  $\text{CHH1b}$  y 7x  $\text{CH}_2$  9d) 4.78 (d,  $J_{AB} = 9.9$  Hz, 21H, 7x3  $\text{CHH1b}$ ), 5.13 (s, 21H, 7x3  $\text{H1a}$ ), 7.33 (d,  $J_{AB} = 6.4$  Hz, 2H, fenilo), 7.52-7.95 (m, 29H, 2H fenilo, 7x3  $\text{CH}$  triazol 3b y 7x  $\text{CH}$  triazol 11d), 8.01 (s, 1H,  $\text{CH}$  triazol 13').

**$^{13}\text{C}$  RMN** (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):  $\delta$  8.9 ( $\text{CH}_2\text{Si}$  y  $\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 12.1 ( $\text{CH}_3$  in  $\text{C1'}$ ,  $\text{C7'}$ ), 12.6 ( $\text{CH}_3$  in  $\text{C3'}$ ,  $\text{C5'}$ ), 14.8 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 17.2 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ), 18.9 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.9 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 26.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 29.2 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 45.6 ( $\text{C}(\text{CH}_2)_4$ ), 50.4 ( $\text{CH}_2$  4b), 52.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 60.5 ( $\text{CH}_2$  1b), 61.7, 62.1 ( $\text{CH}$  5a y  $\text{CH}_2$  6a), 64.6 ( $\text{CH}_2$  9d), 69.5 ( $\text{OCH}_2$  5b), 69.9 ( $\text{CH}_2$  3c y 1c), 70.4, 70.5, 70.6, 70.6, 70.7, 70.7, 71.0, 71.0 ( $\text{OCH}_2$  6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d y 8d), 72.8 ( $\text{CH}$  4a), 74.9 ( $\text{CH}$  3a), 76.0 ( $\text{CH}$  2a), 97.1 ( $\text{CH}$  1a), 99.8 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 109.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 124.1 ( $\text{CH}$  triazol 3b y 11d), 126.3 ( $\text{CH}$  triazol 13'), 129.0 ( $\text{CH}$  fenilo), 130.8, 132.9, 138.4, 139.9, 143.6 ( $\text{C}$  2b), 145.0, 153.8.

**$^{29}\text{Si}$  RMN** (79.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):  $\delta$  -67.39

**$^{19}\text{F}$  NMR** (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  -146.7 a -145.9 (m, 2F,  $\text{BF}_2$ ).

**UV/Vis** ( $\text{AcOEt}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 523 nm ( $5.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

**$\lambda_{\text{fluorescencia}}$**  ( $\text{AcOEt}$ ): 536 nm ( $\phi = 0.64$ ).

**MALDI-TOF** (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: Calculado:  $[\text{M}+\text{H}]^+ 14437$ , encontrado: 14451 probablemente  $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]$

**42**, R =

**<sup>13</sup>C RMN** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 9.4 (CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>Si\*), 12.4, 12.8 (CH<sub>3</sub> in C1', C7', C3', C5'), 14.4 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 15.3 (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 25.0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si\*), 46.8 (C(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>), 51.5 (CH<sub>2</sub> 4b), 53.3 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si\*), 61.0 (CH<sub>2</sub>1b), 63.0 (CH<sub>2</sub> 6a), 65.1 (CH<sub>2</sub> 9d), 68.6 (CH 4a), 70.3 (OCH<sub>2</sub> 5b), 70.9 (CH<sub>2</sub> 1c) 71.0 (CH<sub>2</sub> 3c), 71.4, 71.5, 71.5, 71.5, 71.6, 72.0 (OCH<sub>2</sub> 6b, 7b, 8b, 9b, 10b, 11b, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 8d), 72.2 (CH 2a), 72.5 (CH

3a), 74.9 (CH 5a), 100.8 (CH 1a), 126.3 (CH triazol 3b, 3d y 13'), 129.8 (CH fenilo), 131.8, 134.3, 136.6, 139.6, 142.3, 145.3 (C 2b y C 10d), 155.0

$^{29}\text{Si}$  RMN (79.5MHz,  $\text{CD}_3\text{Cl}$ ):  $\delta$  -66.60, -66.66.

UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 523 nm ( $5.7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$\lambda_{\text{fluorescencia}}$  (MeOH): 536 nm ( $\phi$  = 0.50).

**MALDI-TOF** (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: Calculado 12754, encontrado pico mayoritario centrado en 12832.

### Referencias

- [1] a) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130; b) A. Varki, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**, p. 625-634; c) R. A. Dwek, *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* **1996**, 96, 683-720.
- [2] a) M. Ambrosi, N. R. Cameron and B. G. Davis, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, 3, 1593-1608; b) H.-J. Gabius and Editor, *The Sugar Code: Fundamentals Of Glycosciences*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2009**, p. 569 pp.
- [3] N. Sharon and H. Lis, *Sci Am* **1993**, 268, 82-89.
- [4] a) C. R. Bertozzi and L. L. Kiessling, *Science* **2001**, 291, 2357-2364; b) R. S. Haltiwanger and J. B. Lowe, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 491-537; c) G. W. Hart and R. J. Copeland, *Cell* **2010**, 143, 672-676; d) Jason E. Hudak and Carolyn R. Bertozzi, *Chemistry & Biology* **2014**, 21; e) M. Dalziel, M. Crispin, C. N. Scanlan, N. Zitzmann and R. A. Dwek, *Science* **2014**, 343.
- [5] M. Mammen, S.-K. Chio and G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 2755-2794.
- [6] a) Y. C. Lee and R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 321-327; b) J. J. Lundquist, S. D. Debenham and E. J. Toone, *J Org Chem* **2000**, 65, 8245-8250.
- [7] R. T. Lee and Y. C. Lee, *Glycoconj J* **2000**, 17, 543-551.
- [8] a) M. Reynolds and S. Perez, *C. R. Chim.* **2011**, 14, 74-95; b) M. Mammen, G. Dahmann and G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4179-4190.
- [9] a) C. Maierhofer, K. Rohmer and V. Wittmann, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7661-7676; b) V. Wittmann and R. J. Pieters, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4492-4503.
- [10] a) J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen and L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14922-14933; b) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 2348-2368; c) M. L. Wolfenden and M. J. Cloninger, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 958-966; d) E. M. Munoz, J. Correa, E. Fernandez-Megia and R. Riguera, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17765-17767.
- [11] R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2013-2025.
- [12] a) C. F. Brewer, M. C. Miceli and L. G. Baum, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 616-623; b) G. A. Rabinovich, M. A. Toscano, S. S. Jackson and G. R. Vasta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, 17, 513-520.



- [13] a) N. Jayaraman, *Chemical Society Reviews* **2009**, 38, 3463-3483; b) Y. M. Chabre and R. Roy, *Adv Carbohydr Chem Biochem* **2010**, 63, 165-393; c) J. G. Fernandez-Bolanos, I. Maya and A. Oliete, *Carbohydr. Chem.* **2012**, 38, 303-337.
- [14] a) M. L. Uhrig and J. Kovensky, **2013**, pp. 107-142; b) T. Okada, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2011**, 23, 284-291; c) M. C. Galan, P. Dumy and O. Renaudet, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4599-4612; d) Y. M. Chabre and R. Roy, **2009**, pp. 53-70.
- [15] M. Marradi, F. Chiodo, I. Garcia and S. Penades, *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 4728-4745.
- [16] C. R. Becer, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, 33, 742-752.
- [17] a) Y. M. Chabre and R. Roy, *Curr Top Med Chem* **2008**, 8, 1237-1285; b) Y. M. Chabre and R. Roy, **2012**, pp. 407-438; c) M. A. Mintzer, E. L. Dane, G. A. O'Toole and M. W. Grinstaff, *Mol. Pharmaceutics* **2012**, 9, 342-354.
- [18] M. Lahmann in *Architectures of Multivalent Glycomimetics for Probing Carbohydrate-Lectin Interactions*, Vol. 288 Eds.: T. K. Lindhorst and S. Oscarson), Springer Berlin Heidelberg, **2009**, pp. 183-165.
- [19] a) R. Ballardini, B. Colonna, M. T. Gandolfi, S. A. Kalovidouris, L. Orzel, F. M. Raymo and J. F. Stoddart, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 288-294; b) Y. Lee, J. Kim, S. Kim, W.-D. Jang, S. Park and W.-G. Koh, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 5643-5647.
- [20] J. Barbera, A. C. Garces, N. Jayaraman, A. Omenat, J. L. Serrano and J. F. Stoddart, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2001**, 13, 175-180.
- [21] a) R. J. Kaufman and R. S. Sidhu, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 4941-4947; b) R. Roy, M. C. Trono and D. Giguere, *ACS Symp. Ser.* **2005**, 896, 137-150, 131 Plate.
- [22] a) M. Dubber and T. K. Lindhorst, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5275-5281; b) J. Ni, H. Song, Y. Wang, N. M. Stamatatos and L.-X. Wang, *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17, 493-500.
- [23] a) J. M. Benito, M. Gomez-Garcia, M. C. Ortiz, I. Baussanne, J. Defaye and J. M. G. Fernandez, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10355-10363; b) M. Gomez-Garcia, J. M. Benito, D. Rodriguez-Lucena, J.-X. Yu, K. Chmurski, C. O. Mellet, R. G. Gallego, A. Maestre, J. Defaye and J. M. G. Fernandez, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7970-7971; c) R. V. Vico, J. Voskuhl and B. J. Ravoo, *Langmuir* **2011**, 27, 1391-1397; d) M. Gomez-Garcia, J. M. Benito, A. P. Butera, C. O. Mellet, J. M. G. Fernandez and J. L. J. Blanco, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 1273-1288; e) U. Kauscher and B. J. Ravoo, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, 8, 1543-1551, No. 1175; f) C. Decroocq, A. Joosten, R. Sergeant, B. T. Mena, M. C. Ortiz and P. Compain, *Chembiochem* **2013**, 14, 2038-2049.
- [24] a) C. Chamorro and R. M. J. Liskamp, *J. Comb. Chem.* **2003**, 5, 794-801; b) A. J. van and R. M. J. Liskamp, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2661-2669.
- [25] a) F. Sansone and A. Casnati, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4623-4639; b) S. Aleandri, A. Casnati, L. Fantuzzi, G. Mancini, G. Rispoli and F. Sansone, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 4811-4817.
- [26] a) G. Yu, Y. Ma, C. Han, Y. Yao, G. Tang, Z. Mao, C. Gao and F. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 10310-10313; b) I. Nierengarten, K. Buffet, M. Holler, S. P. Vincent and J.-F. Nierengarten, *Tetrahedron Letters* **2013**, 54, 2398-2402.
- [27] a) H.-K. Lee, K. M. Park, Y. J. Jeon, D. Kim, D. H. Oh, H. S. Kim, C. K. Park and K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5006-5007; b) J. Kim, Y. Ahn, K. M. Park, Y. Kim, Y. H. Ko, D. H. Oh and K. Kim, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46, 7393-7395; c) J. Geng, F. Biedermann, J. M. Zayed, F. Tian and O. A. Scherman, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2011**, 44, 4276-4281; d) J. Kim, Y. Ahn, K. M. Park, D.-W. Lee and K. Kim, **2010**, pp. ORGN-320.
- [28] a) X. Wang, E. Matei, L. Deng, L. Koharudin, A. M. Gronenborn, O. Ramstrom and M. Yan, *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 47, 258-264; b) Y. Kotsuchibashi, Y. Zhang, M. Ahmed, M. Ebara, T. Aoyagi and R. Narain, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2013**, 101A, 2090-2096.

- [29] a) C. Earhart, N. R. Jana, N. Erathodiyil and J. Y. Ying, *Langmuir* **2008**, *24*, 6215-6219; b) C. Chien-Tien, S. M. Yogesh, B. S. Santosh, W. Yi-Ching, L. Ruo-Kai, L. Chun-Cheng, C. Chia-Chun and L. Y-Hasin, *Advanced Functional Materials* **2008**, *18*, 527-540; c) A. Saha, S. K. Basiruddin, A. R. Maity and N. R. Jana, *Langmuir* **2013**, *29*, 13917-13924; d) D. Benito-Alifonso, S. Tremel, B. Hou, H. Lockyear, J. Mantell, D. J. Fermin, P. Verkade, M. Berry and M. C. Galan, *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**.
- [30] N. P. Pera, A. Kouki, S. Haataja, H. M. Branderhorst, R. M. J. Liskamp, G. M. Visser, J. Finne and R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2425-2429.
- [31] a) K. Matsuura, K. Hayashi and N. Kimizuka, *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 212-213; b) L. Gu, P. G. Luo, H. Wang, M. J. Mezziani, Y. Lin, L. M. Veca, L. Cao, F. Lu, X. Wang, R. A. Quinn, W. Wang, P. Zhang, S. Lacher and Y.-P. Sun, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2408-2418; c) P. Wu, X. Chen, N. Hu, U. C. Tam, O. Blixt, A. Zettl and C. R. Bertozzi, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 5022-5025; d) P. G. Luo, H. Wang, L. Gu, F. Lu, Y. Lin, K. A. Christensen, S.-T. Yang and Y.-P. Sun, *ACS Nano* **2009**, *3*, 3909-3916; e) J. Chen, S. S. Wong and I. Ojima in *Carbon nanotube-based drug delivery systems*, Vol. Brookhaven Science Associates, LLC, USA . **2010**, p. 32pp; f) H. Vedala, Y. Chen, S. Cecioni, A. Imberty, S. Vidal and A. Star, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 170-175; g) M. Assali, L. M. Pernia, I. Fernandez and N. Khiar, *Nanotechnology* **2013**, *24*, 085604/085601-085604/085612, 085612 pp.
- [32] a) H. Kato, A. Yashiro, A. Mizuno, Y. Nishida, K. Kobayashi and H. Shinohara, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2935-2939; b) H. Isobe, K. Cho, N. Solin, D. B. Werz, P. H. Seeberger and E. Nakamura, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4611-4614; c) H. Kato, C. Boettcher and A. Hirsch, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2659-2666; d) P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, B. T. Mena, M. C. Ortiz and J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756, S5753/5751-S5753/5725; e) J.-F. Nierengarten, J. Iehl, V. Oerthel, M. Holler, B. M. Illescas, A. Munoz, N. Martin, J. Rojo, M. Sanchez-Navarro, S. Cecioni, S. Vidal, K. Buffet, M. Durka and S. P. Vincent, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2010**, *46*, 3860-3862; f) R. Risquez-Cuadro, F. J. M. Garcia, J.-F. Nierengarten and M. C. Ortiz, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 16791-16803.
- [33] M.-E. Ragoussi, S. Casado, R. Ribeiro-Viana, G. d. I. Torre, J. Rojo and T. Torres, *Chemical Science* **2013**, *4*, 4035-4041.
- [34] a) E. Kaltgrad, M. K. O'Reilly, L. Liao, S. Han, J. C. Paulson and M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4578-4579; b) T. Meldrum, K. L. Seim, V. S. Bajaj, K. K. Palaniappan, W. Wu, M. B. Francis, D. E. Wemmer and A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5936-5937; c) R. Ribeiro-Viana, M. Sanchez-Navarro, J. Luczkowiak, J. R. Koeppe, R. Delgado, J. Rojo and B. G. Davis, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 2302/2301-2302/2308; d) K. Murray in *Capsid particles of hepatitis B core antigen for presentation of immunogenic components*, Vol. Biogen, Inc., USA . **2000**, p. 60 pp.
- [35] S. Gatard, L. Liang, L. Salmon, J. Ruiz, D. Astruc and S. Bouquillon, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1842-1846.
- [36] a) R. Kikkeri, I. Garcia-Rubio and P. H. Seeberger, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2009**, 235-237; b) R. Kikkeri, X. Liu, A. Adibekian, Y.-H. Tsai and P. H. Seeberger, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2010**, *46*, 2197-2199; c) R. Kikkeri, D. Grunstein and P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10230-10232.
- [37] P. Reeh and M. J. de, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 5259-5262.
- [38] a) D. Dechtrirat, N. Gajovic-Eichelmann, F. F. Bier and F. W. Scheller, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 2233-2239; b) Y. Miura and T. Fukuda, *Kyushu Daigaku Chuo Bunseki Senta Hokoku* **2011**, *28*, 24-30; c) K. Oeberg, J. Ropponen, J. Kelly, P. Loewenhielm, M. Berglin and M. Malkoch, *Langmuir* **2013**, *29*, 456-465; d) H. Zheng and X. Du, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808*, 2128-2135.

- [39] a) F. Osaki, T. Kanamori, S. Sando, T. Sera and Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6520-6521; b) Y. Aoyama, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2005**, *17*, 39-47; c) Y. Aoyama, *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10*, 588-593; d) A. Martinez, M. C. Ortiz and F. J. M. Garcia, *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 4746-4773.
- [40] a) S. Deng, L. Bai, R. Reboulet, R. Matthew, D. A. Engler, L. Teyton, A. Bendelac and P. B. Savage, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1437-1441; b) B. Qu, X. Li, M. Guan, X. Li, L. Hai and Y. Wu, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *72*, 110-118.
- [41] L. L. Kiessling and J. C. Grim, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4476-4491.
- [42] a) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder and P. Smith, *Polym. J. (Tokyo)* **1985**, *17*, 117-132; b) J. A. Cruz and P. Guadarrama, *Materiales Avanzados* **2004**, *3*, 19-28.
- [43] D. Astruc, E. Boisselier and C. Ornelas, *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2010**, *110*, 1857-1959.
- [44] D. A. Tomalia, *New J. Chem.* **2012**, *36*, 264-281.
- [45] a) R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 291-310; b) R. Roy and M. Touaibia in *3.36 - Application of Multivalent Mannosylated Dendrimers in Glycobiology*, Vol. (Ed. H. Kamerling), Elsevier, Oxford, **2007**, pp. 821-870.
- [46] a) R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier and A. Romanowska, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1869-1872; b) P. Niederhafner, J. Sebestik and J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 757-788.
- [47] G. R. Newkome, Z. Yao, G. R. Baker and V. K. Gupta, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003-2004.
- [48] a) P. Wu, M. Malkoch, J. N. Hunt, R. Vestberg, E. Kaltgrad, M. G. Finn, V. V. Fokin, K. B. Sharpless and C. J. Hawker, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2005**, 5775-5777; b) E. Fernandez-Megia, J. Correa, I. Rodriguez-Meizoso and R. Riguera, *Macromolecules* **2006**, *39*, 2113-2120; c) M. E. Pérez-Ojeda, B. Trastoy, Á. Rol, M. D. Chiara, I. García-Moreno and J. L. Chiara, *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 6630-6640.
- [49] a) F. Perez-Balderas, M. Ortega-Munoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Hernandez-Mateo, F. G. Calvo-Flores, J. A. Calvo-Asin, J. Isac-Garcia and F. Santoyo-Gonzalez, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1951-1954; b) C. O. Kappe, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250-6284; c) J. A. F. Joosten, N. T. H. Tholen, M. F. A. El, A. J. Brouwer, E. G. W. van, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp and R. J. Pieters, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3182-3185.
- [50] a) C. J. Hawker and J. M. J. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638-7647; b) P. R. Ashton, S. E. Boyd, C. L. Brown, N. Jayaraman, S. A. Nepogodiev and J. F. Stoddart, *Chem. - Eur. J.* **1996**, *2*, 1115-1128.
- [51] a) B. D. Polizzotti, R. Maheshwari, J. Vinkenborg and K. L. Kiick, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2007**, *40*, 7103-7110; b) R. H. Kramer and J. W. Karpen, *Nature (London)* **1998**, *395*, 710-713; c) E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde and W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663-2664; d) T. K. Lindhorst, *Top. Curr. Chem.* **2002**, *218*, 201-235; e) P. I. Kitov, H. Shimizu, S. W. Homans and D. R. Bundle, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3284-3294; f) J. Numata, A. Juneja, D. J. Diestler and E.-W. Knapp, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 2595-2604; g) E. T. Mack, P. W. Snyder, R. Perez-Castillejos, B. Bilgic, D. T. Moustakas, M. J. Butte and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 333-345.
- [52] X.-L. Meng, Y. Fang, L.-S. Wan, X.-J. Huang and Z.-K. Xu, *Langmuir* **2012**, *28*, 13616-13623.
- [53] a) J.-I. Sakamoto, T. Koyama, D. Miyamoto, S. Yingsakmongkon, K. I. P. J. Hidari, W. Jampangern, T. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Esumi, K. Hatano, D. Terunuma and K. Matsuoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 717-721; b) K. Matsuoka, T. Koyama and K. Hatano, *Open Glycosci.* **2012**, *5*, 31-40; c) D. Wrobel, K. Kolanowska, A. Gajek, R. Gomez-Ramirez, I. M. J. de, E. Pedziwiatr-Werbicka, B. Klajnert, I. Waczulikova and M. Bryszewska, *Biochim Biophys*

- Acta* **2013**; d) E. Fuentes-Paniagua, J. M. Hernandez-Ros, M. Sanchez-Milla, M. A. Camero, M. Maly, J. Perez-Serrano, J. L. Copa-Patino, J. Sanchez-Nieves, J. Soliveri, R. Gomez and d. I. M. F. Javier, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1256-1265.
- [54] a) K. Matsuoka, H. Oka, T. Koyama, Y. Esumi and D. Terunuma, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3327-3330; b) M. M. K. Boysen and T. K. Lindhorst, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3895-3898; c) T. Mori, K. Hatano, K. Matsuoka, Y. Esumi, E. J. Toone and D. Terunuma, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2751-2760.
- [55] C. Kim and A. Kwon, *Synthesis* **1998**, 105-108.
- [56] T. L. Kaneshiro and Z.-R. Lu, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5660-5666.
- [57] Q.-C. Zou, Q.-J. Yan, G.-W. Song, S.-L. Zhang and L.-M. Wu, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1461-1465.
- [58] a) R. Y. Kannan, H. J. Salacinski, J.-e. Ghanavi, A. Narula, M. Odlyha, H. Peirovi, P. E. Butler and A. M. Seifalian, *Plast. Reconstr. Surg.* **2007**, *119*, 1653-1662; b) H. Ghanbari, A. G. Kidane, G. Burriesci, B. Ramesh, A. Darbyshire and A. M. Seifalian, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4249-4260; c) H. Ghanbari, B. G. Cousins and A. M. Seifalian, *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, *32*, 1032-1046; d) A. O. Oseni, P. E. Butler and A. M. Seifalian, *J Tissue Eng Regen Med* **2013**.
- [59] a) F. J. Feher, K. D. Wyndham and D. J. Knauer, *Chem. Commun. (Cambridge)* **1998**, 2393-2394; b) F. J. Feher, K. D. Wyndham, D. Soulivong and F. Nguyen, *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1999**, 1491-1497; c) Y. Gao, A. Eguchi, K. Kakehi and Y. C. Lee, *Organic Letters* **2004**, *6*, 3457-3460; d) S. Fabritz, D. Heyl, V. Bagutski, M. Empting, E. Rikowski, H. Frauendorf, I. Balog, W.-D. Fessner, J. J. Schneider, O. Avrutina and H. Kolmar, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 2212-2218; e) B. Trastoy, M. Eugenia Perez-Ojeda, R. Sastre and J. Luis Chiara, *Chemistry-a European Journal* **2010**, *16*, 3833-3841; f) D. Heyl, E. Rikowski, R. C. Hoffmann, J. J. Schneider and W.-D. Fessner, *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 5544-5548; g) W.-B. Zhang, Y. Li, X. Li, X. Dong, X. Yu, C.-L. Wang, C. Wesdemiotis, R. P. Quirk and S. Z. D. Cheng, *Macromolecules* **2011**, *44*, 2589-2596; h) B. Trastoy, D. A. Bonsor, M. Eugenia Perez-Ojeda, M. Luisa Jimeno, A. Mendez-Ardoy, J. M. Garcia Fernandez, E. J. Sundberg and J. L. Chiara, *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 3191-3201; i) M. Lo Conte, S. Staderini, A. Chambery, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet, A. Marra and A. Dondoni, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10*, 3269-3277; j) A. Marra, S. Staderini, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet and A. Dondoni, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 1144-1149.
- [60] a) K. Tanaka, N. Kitamura, K. Inafuku and Y. Chujo, *Photomed. Photobiol.* **2009**, *31*, 15-16; b) K. Tanaka, K. Inafuku, K. Naka and Y. Chujo, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3899-3901; c) K. Tanaka, J.-H. Jeon, K. Inafuku and Y. Chujo, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 915-919.
- [61] I. Botos and A. Wlodawer, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, *88*, 233-282.
- [62] a) M. Hartmann and T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 3583-3609; b) T. K. Lindhorst, *Carbohydr. Chem.* **2012**, *37*, 194-207.
- [63] E. Caparros, P. Munoz, E. Sierra-Filardi, D. Serrano-Gomez, A. Puig-Kroger, J. L. Rodriguez-Fernandez, M. Mellado, J. Sancho, M. Zubiaur and A. L. Corbi, *Blood* **2006**, *107*, 3950-3958.
- [64] AB3 denota los sustituyentes de la ramificación siendo A la rama que contiene el grupo funcional reactivo para el anclaje (punto focal) y B los grupos funcionalizables con los epítomos.
- [65] a) P. Langer, S. J. Ince and S. V. Ley, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 3913-3916; b) T. K. Lindhorst, M. Dubber, U. Krallmann-Wenzel and S. Ehlers, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2027-2034; c) H. Al-Mughaid and T. B. Grindley, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1390-1398.

- [66] J. Sebestik, Reinis, Milan, Jezek, Jan in *Biomedical Applications of Peptide-, Glyco- and Glycopeptide Dendrimers, and Analogous Dendrimeric Structures*, Vol. Springer Vienna, **2012**.
- [67] K. D. Park, R. Liu and H. Kohn, *Chem. Biol. (Cambridge, MA, U. S.)* **2009**, *16*, 763-772.
- [68] M. S. Cubberley and B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7560-7563.
- [69] M. Goncalves, K. Estieu-Gionnet, T. Berthelot, G. Lain, M. Bayle, X. Canon, N. Betz, A. Bikfalvi and G. Deleris, *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 1411-1421.
- [70] M. Brard, C. Lainé, G. Réthoré, I. Laurent, C. Neveu, L. Lemiègre and T. Benvegny, *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 8267-8279.
- [71] H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [72] a) B. A. Trofimov, *Current Organic Chemistry* **2002**, *6*, 1121-1162; b) B. A. Trofimov and N. K. Gusarova, *Russian Chemical Reviews* **2007**, *76*, 507-527.
- [73] a) G. Barre, D. Taton, D. Lastcoueres and J. M. Vincent, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 7764-7765; b) N. Candelon, D. Lastcoueres, A. K. Diallo, J. R. Aranzaes, D. Astruc and J.-M. Vincent, *Chemical Communications* **2008**, 741-743.
- [74] K. Oscarsson, S. Oscarson, L. Vrang, E. Hamelink, A. Hallberg and B. Samuelsson, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1235-1246.
- [75] M. Sánchez-Navarro, A. Muñoz, B. M. Illescas, J. Rojo and N. Martín, *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 766-769.
- [76] E. Fernandez-Megia, J. Correa and R. Riguera, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3104-3111.
- [77] D. Gupta, T. K. Dam, S. Oscarson and C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 6388-6392.
- [78] I. J. Goldstein and P. R.D., *The Lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*, Academic Press, Inc., New York, **1986**, p.
- [79] P. N. Kanelloupolous, K. Pavlou, A. Perrakis, B. Agianian, C. E. Vorgias, C. Mavrommatis, M. Soufi, P. A. Tucker and S. J. Hamodrakas, *J. Struct. Biol.* **1996**, *116*, 345-355.
- [80] D. S. Goodsell in *Concanavalin A and circular permutation*, Vol. RCSB Protein Data Bank, **2010**.
- [81] W.-w. Li, J.-y. Yu, H.-l. Xu and J.-k. Bao, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *414*, 282-286.
- [82] a) M. Kapoor, C. J. Thomas, K. Bachhawat-Sikder, S. Sharma and A. Surolia, *Methods Enzymol.* **2003**, *362*, 312-329; b) R. B. M. Schasfoort, A. J. Tudos and Editors, *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, Royal Society of Chemistry, **2008**, p. 403 pp.
- [83] M. Vila-Perello, G. R. Gutierrez and D. Andreu, *Chembiochem* **2005**, *6*, 1831-1838.
- [84] L. Nieba, A. Krebber and A. Plueckthun, *Anal. Biochem.* **1996**, *234*, 155-165.
- [85] M. L. Wolfenden and M. J. Cloninger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12168-12169.
- [86] J. A. Mielczarski, J. Dong and E. Mielczarski, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 5228-5237.
- [87] a) R. O'Brien, S. E. Harding and B. Z. Chowdhry, *Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry*, Oxford University Press, **2001**, p. 330 pp; b) T. K. Dam and C. F. Brewer, *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* **2002**, *102*, 387-429.
- [88] B. Hoetzer, I. L. Medintz and N. Hildebrandt, *Small* **2012**, *8*, 2297-2326.
- [89] a) F. Wang, W. B. Tan, Y. Zhang, X. Fan and M. Wang, *Nanotechnology* **2006**, *17*, R1-R13; b) S. A. Hilderbrand, *Methods Mol. Biol. (Totowa, NJ, U. S.)* **2010**, *591*, 17-45.
- [90] a) Y. Mi, K. Li, Y. Liu, K.-Y. Pu, B. Liu and S.-S. Feng, *Biomaterials* **2011**, *32*, 8226-8233; b) K. Li, Y.-T. Liu, K.-Y. Pu, S.-S. Feng, R.-Y. Zhan and B. Liu, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 287-294; c) M. E. Pérez-Ojeda, B. Trastoy, Í. López-Arbeloa, J. Bañuelos, Á. Costela, I. García-Moreno and J. L. Chiara, *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 13258-13268; d) J. Liu, G. Feng, D. Ding and B. Liu, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 4326-4334.

- [91] a) X. Zhao, S. Wang, W. Zhang, J. Qiu, Y. Wu, H. Liu, C. Xu and X. Hao, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 598-604; b) S. Ghaderi, B. Ramesh and A. M. Seifalian, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *12*, 4928-4935; c) S. B. Rizvi, L. Yildirim, S. Ghaderi, B. Ramesh, A. M. Seifalian and M. Keshtgar, *Int J Nanomedicine* **2012**, *7*, 3915-3927.
- [92] a) R. Y. Kannan, H. J. Salacinski, K. M. Sales, P. E. Butler and A. M. Seifalian, *Cell Biochem. Biophys.* **2006**, *45*, 129-136; b) S. A. Corr, A. O'Byrne, Y. K. Gun'ko, S. Ghosh, D. F. Brougham, S. Mitchell, Y. Volkov and A. Prina-Mello, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2006**, 4474-4476; c) K.-Y. Pu, K. Li and B. Liu, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2010**, *22*, 643-646; d) D. Ding, K.-Y. Pu, K. Li and B. Liu, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 9837-9839; e) F. Olivero, F. Reno, F. Carniato, M. Rizzi, M. Cannas and L. Marchese, *Dalton Transactions* **2012**, *41*, 7467-7473; f) J. Ferguson, L. Wilson and H. Rathnayake, **2012**, pp. ORGN-812; g) S. Hoerner, S. Fabritz, H. D. Herce, O. Avrutina, C. Dietz, R. W. Stark, M. C. Cardoso and H. Kolmar, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 2258-2265.
- [93] a) K. Tanaka, K. Inafuku, K. Naka and Y. Chujo, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008**, *6*, 3899-3901; b) Z.-R. Lu and T. Kaneshiro in *Preparation and pharmaceutical uses of dendritic poly(amino acid derivatives) complexes*, Vol. University of Utah Research Foundation, USA . **2008**, p. 62pp; c) R.-M. Nita, I. Lacatusu, N. Badea, C. Nichita and A. Meghea, *Sci. Bull. - Univ. "Politeh." Bucharest, Ser. B* **2011**, *73*, 123-132; d) C. Blair and H. Rathnayake, **2013**, pp. ORGN-243.
- [94] M. Eugenia Perez-Ojeda, B. Trastoy, I. Lopez-Arbeloa, J. Banuelos, A. Costela, I. Garcia-Moreno and J. Luis Chiara, *Chemistry-a European Journal* **2011**, *17*, 13258-13268.
- [95] a) P. Banks, M. Gosselin and L. Prystay, *J. Biomol. Screening* **2000**, *5*, 329-334; b) J. Kim, S. Felts, L. Llauger, H. He, H. Huezo, N. Rosen and G. Chiosis, *J. Biomol. Screening* **2004**, *9*, 375-381.
- [96] J. Qian, B. P. Holskin, J. Theroff, T. Underiner, S. L. Meyer and T. S. Angeles, *Assay Drug Dev. Technol.* **2012**, *10*, 375-381.
- [97] J. A. Levitt, P.-H. Chung, M. K. Kuimova, G. Yahiloglu, Y. Wang, J. Qu and K. Suhling, *Chemphyschem* **2011**, *12*, 662-672.
- [98] in Vol. (Ed. L. T. (TM)).
- [99] P. F., *J. Phys Radium* **1926**, *7*, 390-401.
- [100] K. Kakehi, Y. Oda and M. Kinoshita, *Anal. Biochem.* **2001**, *297*, 111-116.
- [101] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, **1983**, p. 496 pp.
- [102] E. Salomonsson in *Reading a Glycocode. Mechanism and function of galectin-glycan interactions*, Vol. Lund University, Lund, **2011**.
- [103] P. Soerme, B. Kahl-Knutsson, M. Huflejt, U. J. Nilsson and H. Leffler, *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 36-47.
- [104] U. Svajger, M. Anderluh, M. Jeras and N. Obermajer, *Cellular Signalling* **2010**, *22*, 1397-1405.
- [105] T. B. H. Geijtenbeek, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk and C. G. Figdor, *Cell* **2000**, *100*, 575-585.
- [106] B. Lepenies, J. Lee and S. Sonkaria, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65*, 1271-1281.
- [107] in *DC-SIGN: friend or foe?*, Vol. (Ed. R. D. s. (R)), **2000**.
- [108] a) G. Tabarani, J. J. Reina, C. Ebel, C. Vives, H. Lortat-Jacob, J. Rojo and F. Fieschi, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2402-2408; b) J. Luczkowiak, S. Sattin, I. Sutkeviciute, J. J. Reina, M. Sanchez-Navarro, M. Thepaut, L. Martinez-Prats, A. Daggetti, F. Fieschi, R. Delgado, A. Bernardi and J. Rojo, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1354-1365; c) R. Ribeiro-Viana, J. J. Garcia-Vallejo, D. Collado, E. Perez-Inestrosa, K. Bloem, Y. van Kooyk and J. Rojo, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3209-3219.

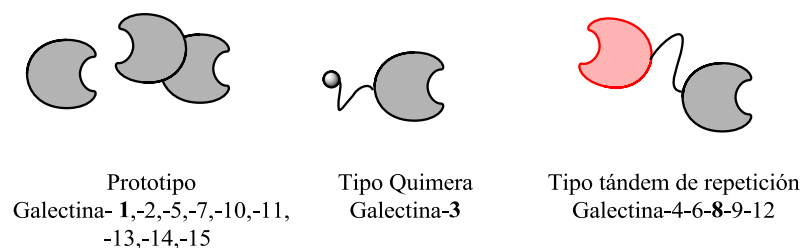
## ***Capítulo 5***

*Síntesis y estudio de glico-POSS multivalentes de  $\beta$ -D-galactosa y lactosa.*

## 5.1 Introducción

Hemos extendido nuestra metodología de síntesis de glico-POSS a otros carbohidratos diferentes de la  $\alpha$ -D-manosa con el fin de estudiar la interacción multivalente de estos nuevos sistemas con otras dianas biológicas. Como veremos más adelante, la generalización de nuestra aproximación sintética para poder incluir carbohidratos diferentes de la D-manosa requirió un rediseño de la estrategia de protección/desprotección de los grupos hidroxilo que respetara la integridad estructural del armazón de octasilsesquioxano.

En particular, nos hemos interesado en la preparación de nuevos glico-POSS funcionalizados con  $\beta$ -D-galactosa y el estudio de su interacción con un grupo de lectinas de gran relevancia biomédica: las galectinas. Las galectinas son una familia de proteínas que reconocen específicamente  $\beta$ -D-galactósidos y que están atrayendo un gran interés por su papel como moduladores de la respuesta inmune y de la progresión de ciertos cánceres. La primera galectina se aisló en 1975,<sup>[1]</sup> aunque no fue hasta 1994 cuando se acuñó el término de galectina y se describieron sus principales propiedades.<sup>[2]</sup> Se estableció que para que una proteína perteneciera a la familia de las galectinas debía cumplir dos requisitos: tener afinidad por  $\beta$ -D-galactósidos y tener una determinada secuencia de aminoácidos en el sitio de unión que había sido determinada por cristalografía de rayos X. Hasta la fecha, es una familia compuesta por 15 miembros distintos aisladas de distintos mamíferos: galectinas-1 a -15.<sup>[3]</sup> Se clasifican en 3 grupos en función de su estructura:<sup>[4]</sup> prototipo, quimera y tándem de repetición, como se muestra en la Figura 5.1.



**Figura 5.1** Clasificación de las galectinas. En negrita se muestran las galectinas estudiadas en esta tesis.

Las galectinas prototipo suelen presentarse en forma de homodímeros no covalentes con dos centros de reconocimiento (CDR) idénticos. La más estudiada es la galectina-1 (peso del monómero = 14.5 KDa).<sup>[5]</sup> Las galectinas de tipo quimera desempeñan su función mediante una interacción dual: con carbohidratos a través de su CDR en el extremo carboxi-terminal y con otros ligandos, como polipéptidos y polinucleótidos, a través de su dominio amino-



terminal, rico en prolina, glicina y tirosina. El único miembro conocido de esta subfamilia es la galectina-3 (29 KDa).<sup>[6]</sup> Las galectinas de tipo tándem de repetición<sup>[7]</sup> tienen secuencias repetitivas y presentan dos CDR's estructuralmente diferentes, siendo la más estudiada la galectina-8 (34 KDa).

La estructura terciaria y cuaternaria de las galectinas prototipo (galectina-1) es similar a la de las lectinas tipo-C de las leguminosas (Con A) que tienden a autoasociarse y formar dímeros no covalentes. La unión entre los monómeros suele darse en sentido opuesto a sus CDRs, de forma que los lugares de unión quedan muy distanciados (>5 nm). Esta disposición espacial opuesta de los CDRs en el dímero hace muy difícil que un ligando bivalente pueda unirse simultáneamente a los dos sitios de unión, lo que impide un incremento en la afinidad por mecanismos de tipo quelato. Sin embargo, dicha geometría convierte a estos sistemas en grandes candidatos para la formación de redes ordenadas basadas en el entrecruzamiento<sup>[8]</sup> (véase la introducción del capítulo 4: mecanismos de multivalencia).

La galectina-8 no forma dímeros, pero presenta de forma natural dos CDRs diferentes (sólo tienen en común un 38% de su secuencia) con distinta afinidad y especificidad. Dependiendo de la longitud del espaciador peptídico que separa ambos CDRs se habla de Gal-8S (de "short", espaciador corto) y de Gal-8L (de "long", espaciador largo). Existen además isoformas en las que sólo se expresa uno de los dos dominios, el CDR de su extremo N-terminal (Gal-8N) o el CDR del extremo C-terminal (Gal-8C). En disolución, la afinidad de ambos dominios es simplemente aditiva (no cooperativa), aunque existen estudios recientes que demuestran que en la superficie celular esta afinidad es sinérgica.<sup>[9]</sup> Es por tanto una proteína muy compleja, pero que, precisamente gracias a su complejidad, puede modular su especificidad de diferentes formas.

En los últimos años, se han encontrado numerosas evidencias de que las galectinas (especialmente Gal-1, -3 y -8) juegan un papel crucial en el cáncer,<sup>[10]</sup> la inflamación,<sup>[11]</sup> y en procesos relacionados con la regulación de la respuesta inmune<sup>[4, 12]</sup> (adhesión linfocitaria, crecimiento y proliferación celular, apoptosis<sup>[13]</sup>...). Estas proteínas contribuyen a las transformaciones que sufren las células cancerígenas y neoplasias, promueven la angiogénesis del tumor, desactivan la respuesta inmune antitumoral y facilitan la metástasis.<sup>[10b]</sup> Sin embargo, esta capacidad de "silenciar" al sistema inmune puede ser beneficiosa para el tratamiento de ciertas alergias y enfermedades autoinmunes.

En situaciones patológicas, la expresión de las galectinas, y por tanto sus concentraciones intracelulares, cambian por lo que empiezan a ser utilizadas como indicadores

de algunas enfermedades. Muchas de las galectinas presentan actividades antagónicas. Así por ejemplo, la Gal-1 y la Gal-3 tienen propiedades contrarias con respecto a los mecanismos de muerte celular programada, resultando que los niveles de Gal-1 y Gal-3 permiten establecer un balance entre proliferación, diferenciación y muerte celular.<sup>[4]</sup>

En consecuencia, el estudio de las galectinas y de los fármacos que regulen o inhiban su actividad se ha convertido en un objetivo de gran interés biomédico actual. La mayor parte de las funciones de las galectinas están mediadas por fenómenos de entrecruzamiento entre sus dímeros y glicoproteínas o ligandos que contienen  $\beta$ -D-galactósidos.<sup>[14]</sup> Estas interacciones multivalentes galectina-glicano se pueden bloquear con éxito con compuestos que muestran una presentación multivalente de unidades de  $\beta$ -D-galactosa, lactosa, o *N*-acetil-lactosamina, con péptidos y con moléculas pequeñas derivadas de carbohidratos o análogos sintéticos.<sup>[8, 15]</sup> Con este fin, hemos sintetizado unos nuevos glico-POSS con siete epítomos de  $\beta$ -D-galactosa o lactosa marcados fluorescentemente y hemos estudiado su interacción con las galectinas-1,-3 y -8, como miembros más representativos de cada familia, empleando para ello la técnica de anisotropía de fluorescencia.<sup>[16]</sup>

## **5.2 Resultados y discusión**

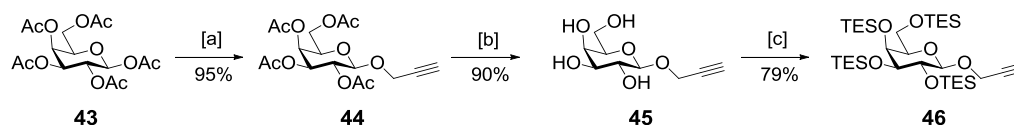
### **5.2.1 Síntesis de glico-POSS de $\beta$ -D-galactosa y lactosa**

Siguiendo la misma estrategia que en el capítulo anterior para la síntesis de glico-POSS marcados con una sonda fluorescente, hemos preparado derivados heptavalentes de  $\beta$ -D-galactosa y lactosa mediante reacción CuAAC. Para ello fue necesario sintetizar los correspondientes derivados funcionalizados con un grupo propargilo para su posterior utilización en la cicloadición 1,3-dipolar con el azido-POSS marcado fluorescentemente **7**.

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se emplearon derivados de carbohidratos protegidos con grupos bencil éter para la reacción CuAAC. Sin embargo, los ensayos de desprotección final mediante hidrogenolisis de los grupos bencilo en condiciones estándar (Pd/C, H<sub>2</sub>, 1-2 atm) resultaron infructuosos, rindiendo mezclas de productos parcialmente bencilados. Por este motivo y dada la inestabilidad de los POSS en condiciones básicas<sup>[17]</sup> y ácidas fuertes, decidimos ensayar otros grupos protectores fácilmente desprotegibles en condiciones suaves. Se seleccionó para ello el grupo trietilsilil éter como grupo protector lábil en condiciones ácidas suaves.

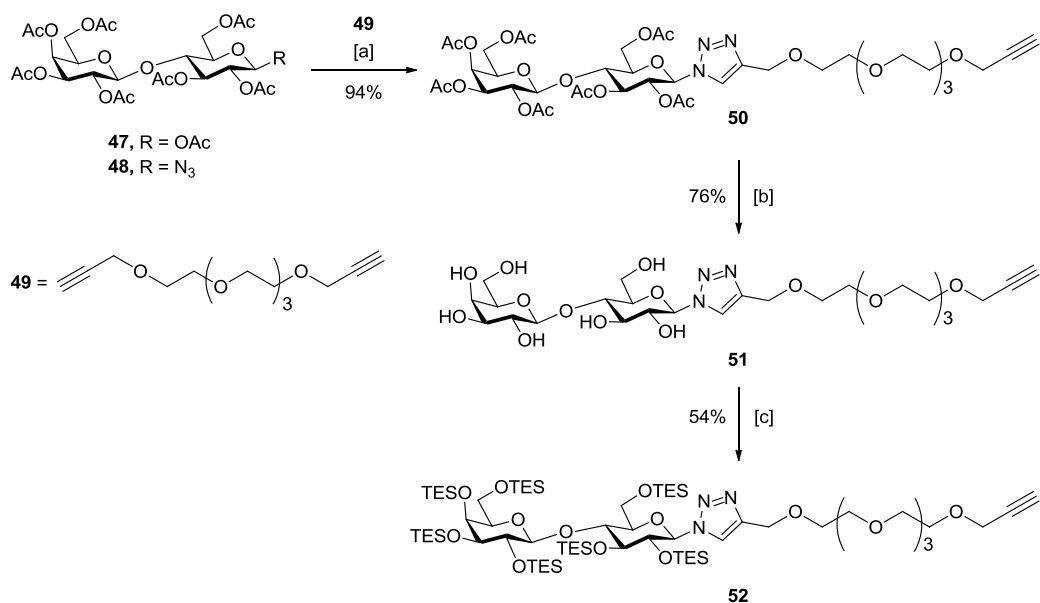
Aunque el grupo trietilsililo es un grupo protector ampliamente empleado en síntesis orgánica, existen muy pocos ejemplos descritos en los que se haya utilizado para la protección temporal de moléculas polihidroxiladas, como los carbohidratos.<sup>[18]</sup> Sin embargo, es un grupo protector muy versátil ya que permite proteger todos los hidroxilos con independencia de la configuración del carbohidrato y se puede desproteger después fácilmente y con elevado rendimiento en condiciones ácidas suaves.

La ruta sintética que hemos seguido para la preparación del derivado propargilado protegido de la  $\beta$ -D-galactosa se muestra en el Esquema 5.1.



**Esquema 5.1** Síntesis del  $\beta$ -D-2,3,4,6-tetraquis-O-(trietilsilil)galactopiranosido de propargilo **46**. [a] alcohol propargílico,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 4.5 h. [b]  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, t.a., 3 h, Amberlita IR-120H<sup>+</sup>. [c]  $\text{Et}_3\text{SiCl}$ , imidazol, DMAP, DMF, 0 °C - t.a., 24 h.

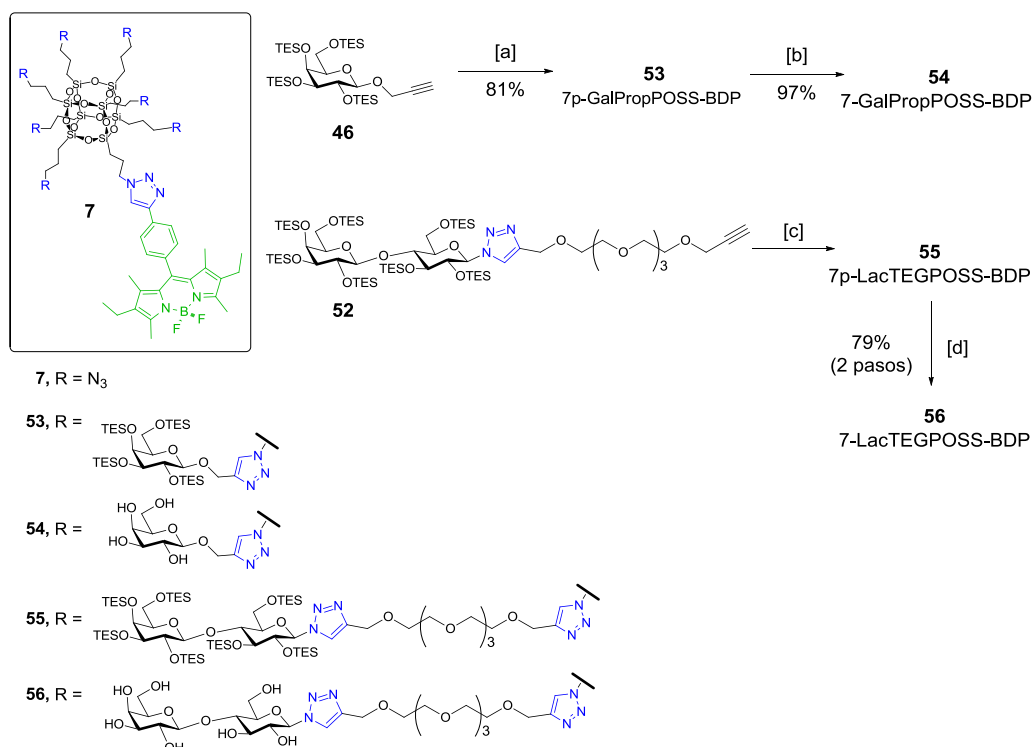
La síntesis del derivado de lactosa se abordó siguiendo otra estrategia. Se ha descrito que la presencia de anillos aromáticos en el carbohidrato favorece la interacción con las galectinas a través de una interacción catión- $\pi$  con los residuos de arginina del CDR.<sup>[15a]</sup> Por ello, decidimos introducir un anillo de 1,2,3-triazol en el carbono anomérico de la lactosa mediante reacción CuAAC entre la glicosil-azida derivada de la lactosa peracetilada (2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil azida)<sup>[19]</sup> (**48**) y el tetraetilenglicol dipropargilado<sup>[20]</sup> (**49**) (Esquema 5.2).



**Esquema 5.2** Ruta sintética del derivado propargilado de lactosa **52**. [a] Tetraetilenglicol dipropargilado **49**,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , ascorbato sódico,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (1:1), 54 h, t.a. [b]  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}$ , 18 h, t.a. [c]  $\text{Et}_3\text{SiCl}$ , imidazol, DMAP, DMF,  $0^\circ\text{C}$  y después 20 h, t.a.

Los derivados propargilados protegidos de  $\beta$ -D-galactosa y lactosa se obtuvieron con rendimientos moderados (54-79%) debido a la labilidad de los grupos trietilsilil éter durante las etapas de aislamiento y purificación. Para minimizar estas desprotecciones, se trató la gel de sílice con un 1-5% de  $\text{Et}_3\text{N}$  para la purificación cromatográfica de estos compuestos. Los compuestos fueron caracterizados inequívocamente por  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, espectrometría de masas (ESI) y espectroscopía FT-IR (ver parte experimental).

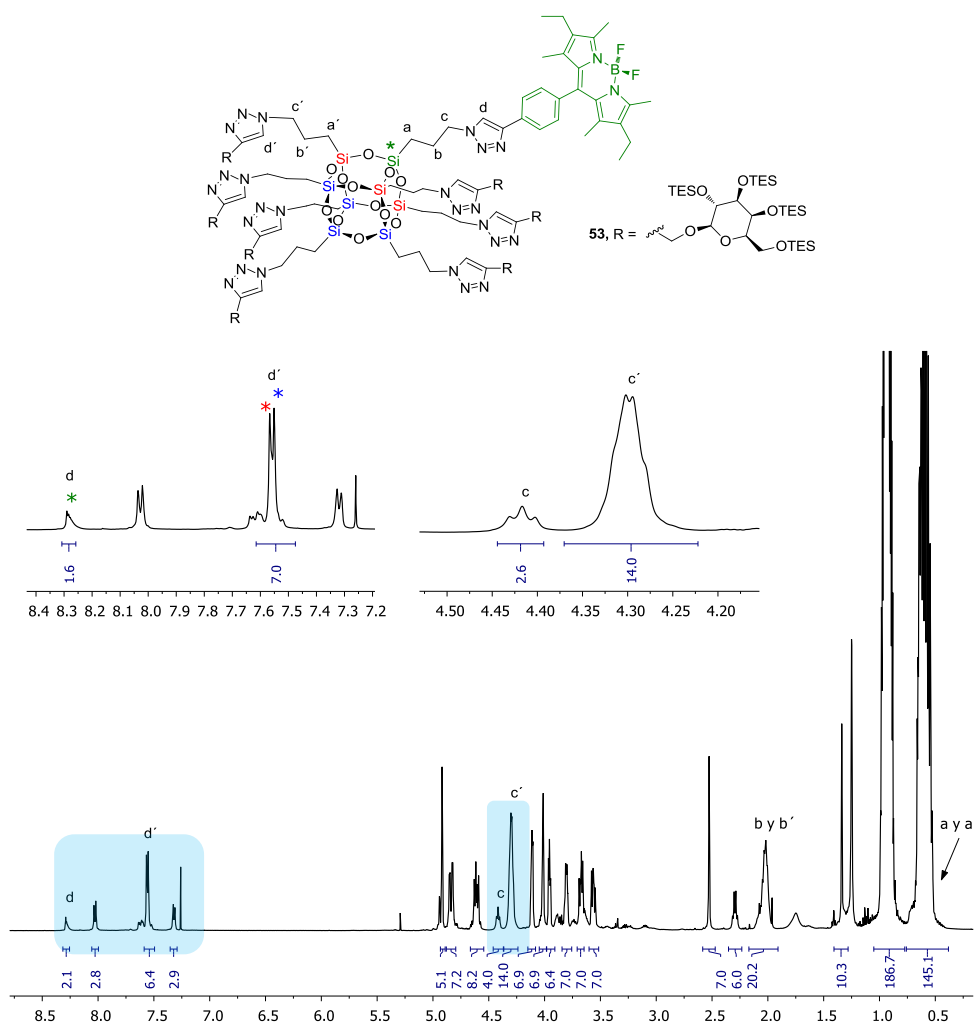
Una vez obtenidos los derivados de  $\beta$ -D-galactosa y lactosa funcionalizados con un grupo alquino terminal, se procedió a llevar a cabo la reacción de CuAAC con el azido-POSS marcado fluorescentemente con un BODIPY (**7**). Para ello, se emplearon las condiciones anteriormente descritas con el catalizador de Cu-tren y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  en tolueno, como se muestra en Esquema 5.3.



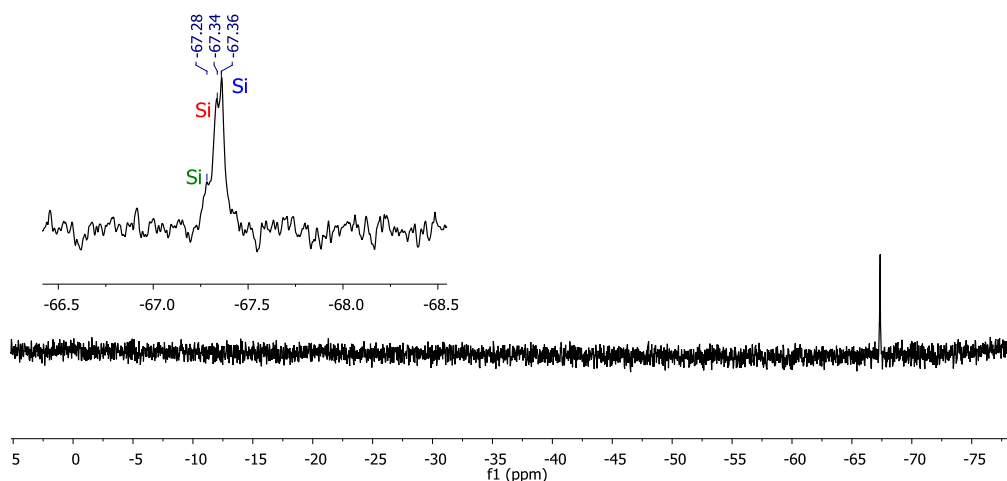
**Esquema 5.3.** Síntesis y desprotección de los glico-POSS de β-D-galactosa y lactosa fluorescentemente marcados. [a] Cu-tren (0.1 eq), *i*Pr<sub>2</sub>NEt (20 eq), tol, 11 h, 80 °C MW. [b] AcOH acuoso al 80% /MeOH/hexano 15:3:1, 15 h, t.a. [c] Cu-tren (0.05 eq), *i*Pr<sub>2</sub>NEt (16 eq), tol, 20, 120 °C. [d] AcOH acuoso al 80% /THF/hexano 4.8:1:1, 22 h, t.a.

La reacción CuAAC para la síntesis de los glico-POSS **53** y **55** transcurrió de forma cuantitativa como muestra el espectro de <sup>1</sup>H RMN del crudo de reacción, aunque debido a la labilidad de los grupos protectores, los productos de las reacciones CuAAC se aislaron con rendimiento moderado (compuesto **53**, 81%). A modo de ejemplo, se muestra la caracterización del glico-POSS **53** protegido con grupos trietilsililo. Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>29</sup>Si RMN presentan los patrones esperados para este tipo de sustitución asimétrica del cubo de POSS (como se explicó en el capítulo anterior, la introducción del colorante en uno de los vértices del POSS rompe la simetría cúbica de los compuestos cambiando de grupo de simetría *O<sub>h</sub>* a *C<sub>3v</sub>*). Se observa una relación de integrales 4:3:1 para los protones de los grupos 1,2,3-triazol y 7(4+3):1 en las señales correspondientes a las cadenas de propilo del silsesquioxano en el espectro de <sup>1</sup>H RMN (Figura 5.2). Se observa también multiplicidad de las señales de <sup>29</sup>Si RMN siguiendo un patrón de intensidades 4:3:1 como se muestra en la Figura 5.3. El espectro de masas (MALDI-TOF) presenta un patrón de picos distanciados entre sí por 115 unidades de

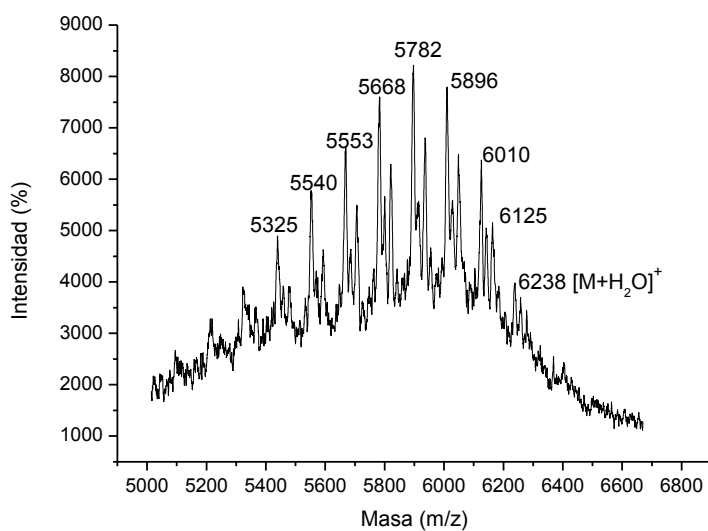
masa correspondientes a la pérdida estadística de grupos trietilsililo por reacción con la matriz ácida (Figura 5.4)



**Figura 5.2** Estructura del compuesto **53** y espectro  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). Las zonas ampliadas se han señalado en azul.



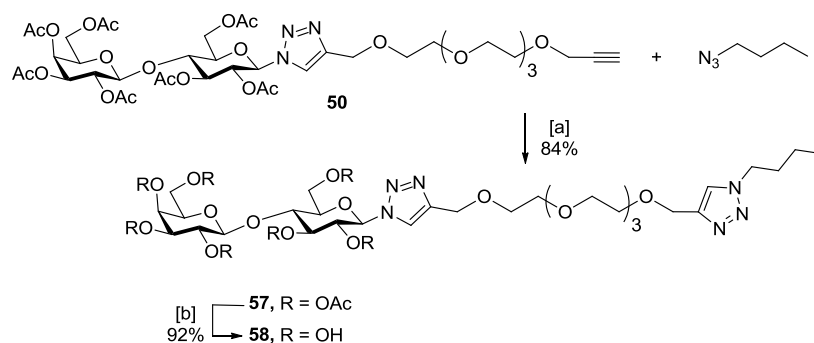
**Figura 5.3** Espectro  $^{29}\text{Si}$  RMN (79.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **53**.



**Figura 5.4** Ampliación de la zona de interés del espectro MALDI-TOF (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) del compuesto **53**. m/z: 6238  $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$  y pérdidas sucesivas de  $\sim 115$  unidades de masa ( $\text{SiEt}_3$ ).

Los glico-POSS **53** y **55** se desprotegeron en condiciones ácidas suaves para dar **54** y **56**, respectivamente, con buenos rendimientos globales (78 y 79% respectivamente) (Esquema 5.3). Todos los compuestos desprotegidos fueron caracterizados por RMN multinuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  y  $^{19}\text{F}$ ), espectrometría de masas (MALDI-TOF) y espectroscopía FT-IR (ver parte experimental y Anexo).

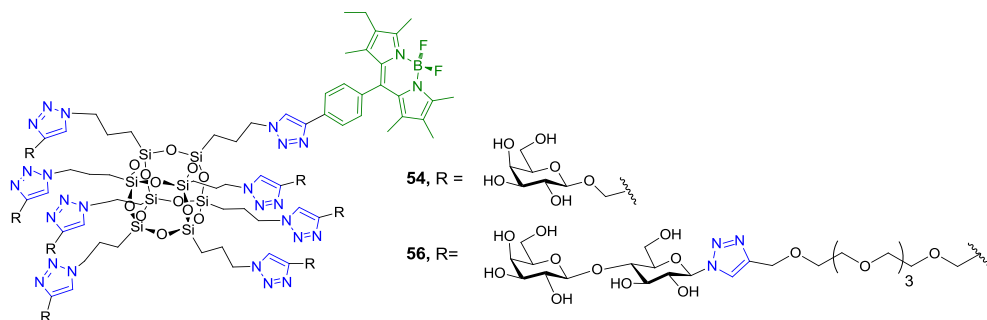
Además de los glico-POSS anteriormente descritos, se preparó el  $\beta$ -lactósido **58** (Esquema 5.4) como modelo monovalente de **55**, para su utilización en los estudios de interacción de los glico-POSS con galectinas. Este compuesto se sintetizó por reacción CuAAC del derivado propargilado **50** con la 1-butilazida, sintetizada a partir de bromuro de *n*-butilo siguiendo un método descrito.<sup>[21]</sup>



**Esquema 5.4** Síntesis del modelo monovalente de lactosa **58**. [a]  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , ascorbato sódico,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$  (1:1), 3 h, t.a. [b]  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 3 h, t.a. Amberlita IR-120  $\text{H}^+$

### 5.2.2 Estudios de interacción entre los glico-POSS de $\beta$ -D-galactosa o lactosa y galectinas

Hemos estudiado la interacción de los glico-POSS fluorescentes **54** y **56** (Figura 5.5) con diferentes galectinas de origen humano mediante anisotropía de fluorescencia en colaboración el grupo del Prof. Hakon Leffler del Departamento de Microbiología, Inmunología y Glicobiología de la Universidad de Lund (Suecia) durante una de las estancias realizadas a lo largo de esta tesis.

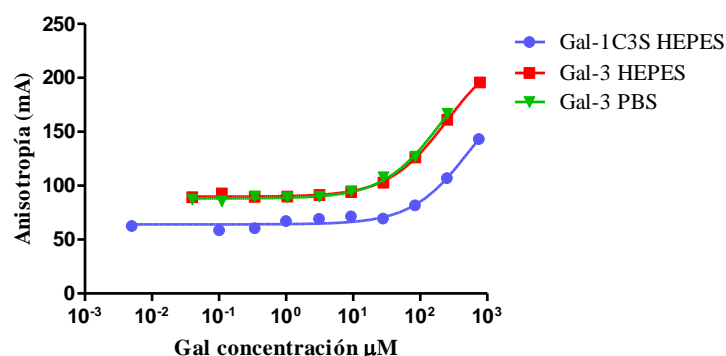


**Figura 5.5** Estructura de los glico-POSS **54** y **56** estudiados como ligandos específicos de galectinas mediante anisotropía de fluorescencia.



### A Estudios de interacción del glico-POSS de $\beta$ -D-galactosa (**54**) con galectinas

Se estudió la interacción del compuesto **54** (7GalPropPOSS-BDP) frente a galectina-1C3S<sup>[22][23]</sup> y galectina-3 de origen humano. Los estudios se llevaron a cabo a pH 7.4 en distintas disoluciones tampón (HEPES y PBS) para comprobar si existía alguna influencia de la composición salina sobre la interacción carbohidrato-proteína. Se valoró una disolución de concentración fija (0.1  $\mu$ M) del glico-POSS frente a concentraciones crecientes de proteína (0-780  $\mu$ M). Los valores de anisotropía registrados se muestran en la Figura 5.6.



**Figura 5.6.** Valoración de anisotropía de fluorescencia del compuesto **54** (7GalPOSS-BDP) (0.1  $\mu$ M) con Gal-1C3S y Gal-3 a temperatura ambiente y pH = 7.4. Debería obtenerse el mismo valor de  $A_0$  en todas las valoraciones ya que se trata del mismo ligando. Los valores inferiores encontrados en la curva con Gal-1C3S se deben a un incremento de la temperatura ambiente en esta valoración en particular, que afecta a la rotación molecular y con ello al valor de la anisotropía.

El glico-POSS **54** no presenta una afinidad muy elevada por las galectinas por lo que no fue posible alcanzar la saturación del ligando con la proteína en estas valoraciones (las galectinas no son solubles a concentraciones muy elevadas por lo que no se pudieron valorar puntos a concentraciones superiores a 780  $\mu$ M). A partir de los valores de anisotropía, se calcularon las  $K_D$  ajustando los puntos de la gráfica a la ecuación 5.1 para un modelo de interacción 1:1, donde  $A$  es el valor de anisotropía medido para una concentración de galectina  $[G]$ .<sup>[16b]</sup> Las medidas se realizaron por duplicado y los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.1, junto con sus correspondientes desviaciones estándar.

$$A = A_0 + (A_{\max} - A_0) \times ([G]/(K_D + [G])) \quad (\text{Ec 5.1})$$

**Tabla 5.1** Resultados de la valoración de **54** frente a varias galectinas humanas mediante AF.

	Gal-1C3S <sup>[a]</sup>	Gal-3 <sup>[a]</sup>	Gal-3 <sup>[b]</sup>
$A_0$ (mA)	$64 \pm 1$	$90 \pm 1$	$88 \pm 1$
$A_{\text{máx}}$ (mA)	$201 \pm 23$	$230 \pm 5$	$229 \pm 14$
$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	$\geq 551 \pm 182$	$\geq 247 \pm 21$	$\geq 207 \pm 37$

<sup>[a]</sup> Se empleó el tampón HEPES <sup>[b]</sup> Se empleó el tampón PBS a pH 7.4.

Comparando las  $K_D$  obtenidas para Gal-3 en tampón HEPES y PBS, se observa que la disolución tampón empleada no parece afectar a la interacción glico-POSS/proteína ya que las diferencias encontradas entre ambos medios están dentro del margen de error experimental. Los resultados obtenidos para **54** se comparan con los descritos para el  $\beta$ -D-galactopiranosido de metilo<sup>[24]</sup> en la Tabla 5.2. Dado que los valores de  $A_{\text{máx}}$  medidos no corresponden realmente al ligando totalmente complejoado con la lectina, las constantes termodinámicas de disociación  $K_D$  estimadas serán inferiores a las reales. No obstante, se puede estimar un límite superior de la  $K_D$  para estos compuestos. Para ello, hemos extrapolado las curvas experimentales de forma lineal a partir de los dos últimos puntos considerando además que el valor máximo posible de la anisotropía de fluorescencia es de 400 mA (ver Capítulo 4). Con estas premisas, se calcularon los valores de  $K_D$  máxima posible para el glico-POSS **54** frente a Gal-1C3S y Gal-3 de 1954  $\mu\text{M}$  y 1500  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Las constantes obtenidas para nuestro ligando multivalente mejoran 3 y 10 veces, como mínimo, las del derivado monovalente correspondiente, lo que confirma el incremento de afinidad por mecanismos de multivalencia. Esta mejora de afinidad se puede expresar en función del parámetro  $\beta$  de Whitesides,<sup>[25]</sup> que recordemos que se define como el cociente entre la constante de afinidad del compuesto multivalente y la constante de afinidad del derivado monovalente correspondiente:  $\beta = K_A^{\text{poli}}/K_A^{\text{mono}} = K_D^{\text{mono}}/K_D^{\text{poli}}$ . Así, la constante de disociación del glico-POSS **54** con Gal-3 es de 3 a 21 veces menor que para el  $\beta$ -D-galactopiranosido de metilo

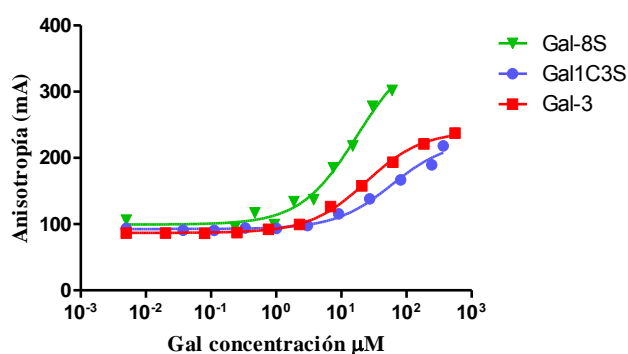
**Tabla 5.2** Valores de  $K_D$  ( $\mu\text{M}$ ) estimados por AF empleando el tampón PBS

	Gal-1C3S	Gal-3
Me- $\beta$ -D-galactopiranososa	$>10000$ <sup>[a]</sup>	$4400 \pm 800$
<b>54</b>	$\geq 551 \pm 182$ ( $\beta > 18$ )	$\geq 207 \pm 37$ ( $\beta = 21.2$ )

<sup>[a]</sup> Evaluado hasta concentraciones de 5 mM. No se consideran buenos ligandos los compuestos que presentan  $K_D > 10$  mM.

### B Estudios de interacción del glico-POSS de lactosa (**56**) con galectinas

Se estudió la interacción entre el glico-POSS **56** (7LacTEGPOSS-BDP) funcionalizado con lactosas y galectinas humanas de las tres familias existentes. Se eligieron para ello Gal-1C3S, Gal-3 y Gal-8S como miembros más representativos de cada familia. Estos estudios se han llevado a cabo a pH 7.4 en disolución tamponada con HEPES. Se realizó una valoración del ligando a concentración fija (0.1  $\mu\text{M}$ ) empleando concentraciones crecientes de proteína (0-550  $\mu\text{M}$ ). Los valores de anisotropía registrados se muestran en la Figura 5.7.



**Figura 5.7** Valoración de anisotropía de fluorescencia del compuesto **56** (0.1  $\mu\text{M}$ ) con Gal-1C3S, Gal-3 y Gal-8S en tampón HEPES a pH 7.4 y a temperatura ambiente.

Las curvas se ajustaron provisionalmente al modelo de complejación 1:1 según la Ecuación 5.1 y se obtuvieron las constantes termodinámicas de disociación que se recogen en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3** Resultados de la valoración de **56** frente a varias galectinas.

	Gal-1C3S	Gal-3	Gal-8S
$A_0$ (mA)	$93 \pm 2$	$87 \pm 1$	$99 \pm 5$
$A_{\text{máx}}$ (mA)	$226 \pm 8$	$240 \pm 2$	$367 \pm 22$
$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	$60 \pm 13$	$24 \pm 2$	$17 \pm 4$

Para evaluar el incremento de afinidad que se consigue por el carácter multivalente del ligando es conveniente comparar estos resultados con los valores obtenidos para derivados monovalentes de lactosa para estas mismas galectinas medidos previamente por otros autores empleando también anisotropía de fluorescencia (Tabla 5.4). La lactosa se ha estudiado en numerosas ocasiones como ligando de las galectinas por diferentes métodos. Por ejemplo,

existe un estudio en el que se determinó la  $K_D$  de la interacción de la lactosa con Gal-1 mediante RMN ( $K_D = 520 \mu\text{M}$ ),<sup>[26]</sup> que es del mismo orden de magnitud que el valor medido mediante calorimetría ( $K_D = 330 \mu\text{M}$ ).<sup>[27]</sup>

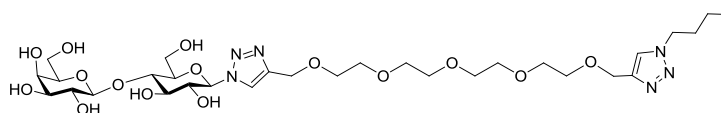
**Tabla 5.4** Valores de  $K_D$  ( $\mu\text{M}$ ) determinados por anisotropía de fluorescencia.

	Gal-1C3S	Gal-3	Gal-8S
Lactosa <sup>[28]</sup>	-	-	195
$\beta$ -Me-lactosa <sup>[29]</sup>	$187 \pm 44$ <sup>[a]</sup>	$160 \pm 57$	-
<b>56</b>	$60 \pm 13$ ( $\beta = 3.1$ )	$24 \pm 2$ ( $\beta = 6.7$ )	$17 \pm 4$ ( $\beta = 11.5$ )

<sup>[a]</sup> Medido a 4 °C.

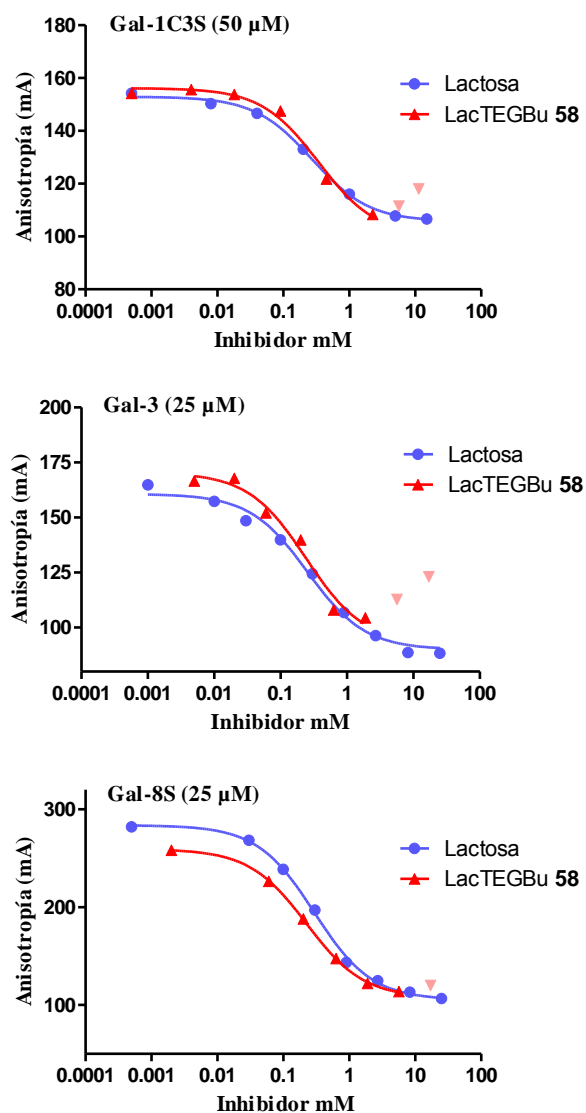
En todos los casos, nuestro ligando heptalactósido **56** tiene una afinidad por estas lectinas que es 3 a 6 veces superior a la del derivado monovalente gracias al efecto multivalente, siendo más efectivo este efecto en la interacción con Gal-8S, con la que se mejora la afinidad en 11 veces con respecto a la de la lactosa monovalente (1.6 veces por epítipo) (Tabla 5.4). El glico-POSS de lactosa **56** presenta mayor afinidad (menor  $K_D$ ) que otros clústeres multiméricos de lactosa, preparados igualmente por reacción click, que han sido estudiados previamente frente a Gal-1C3S y Gal-3 por otros autores.<sup>[15b]</sup>

De nuevo, y como se explicó en el Capítulo 4, para evitar las posibles interferencias de los procesos de agregación de nuestros glico-POSS en medio acuoso (Capítulo 6) se realizaron también experimentos de competición. Los ensayos de competición se llevaron a cabo con dos derivados monovalentes diferentes: lactosa y un análogo monovalente (**58**) del glico-POSS **56** en el que el núcleo inorgánico de POSS se ha sustituido por un grupo metilo y que presenta el mismo espaciador que **56** para estudiar así si existe alguna influencia del espaciador sobre la interacción (Figura 5.8).



**Figura 5.8** Estructura del modelo monovalente **58**.

Se realizaron los ensayos de competición con ambos ligandos monovalentes (a los que llamaremos inhibidores para diferenciarlos del ligando glico-POSS) sobre los complejos entre el ligando **56** (7LacTEGPOSS-BDP) y las tres galectinas estudiadas, empleando una cantidad fija de proteína y de ligando y concentraciones crecientes del inhibidor (mM) (Figura 5.9).



**Figura 5.9** Curvas de valoración de anisotropía de fluorescencia de la competición con lactosa (azul) o con el lactósido modelo **58** (rojo) de la complejación entre **56** (0.1  $\mu$ M) y Gal-1C3S (50  $\mu$ M), Gal-3 (25  $\mu$ M) o Gal-8S (25  $\mu$ M) en tampón HEPES a pH 7.4 y a temperatura ambiente. Los últimos puntos de los experimentos de competición con **58** no se incluyeron en el ajuste ya que se desvían de la tendencia, están representados en un tono más claro (ver explicación más adelante).

El tratamiento de los datos de las curvas de competición como se describió en el Capítulo 4 (Ecuación 4.11) nos permitió obtener las constantes de inhibición así como los valores de  $IC_{50}$  de los dos inhibidores monovalentes frente a la complejación del glico-POSS

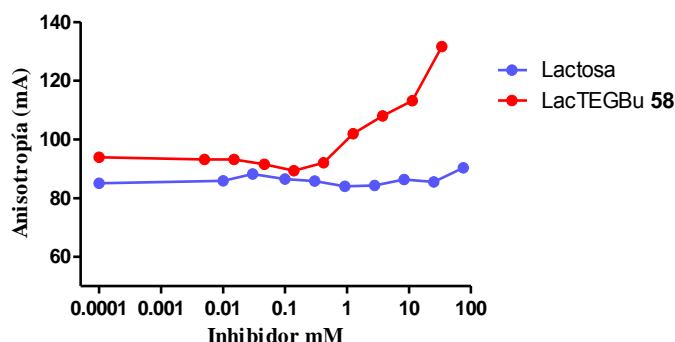
**56** con cada lectina (Tabla 5.5). De los ensayos de competición, se comprueba que el glico-POSS heptavalente de lactosa es mejor ligando (mejora su afinidad en 2-3 órdenes de magnitud) que el correspondiente lactósido monovalente cuando ambos compiten por la lectina en el medio. Los valores de  $K_i$  e  $IC_{50}$  para los inhibidores ensayados frente a Gal-1C3S están sobreestimados, como se explicó anteriormente para el compuesto **54** 7GalPropPOSS, debido a que el ligando **56** se une a Gal-1C3S con una afinidad relativamente baja (de 2 a 4 veces menor que a Gal-3 y Gal-8S) por lo que, como ya se ha comentado, en las valoraciones de anisotropía no se pudo alcanzar la meseta correspondiente a la complejación total del ligando de forma que los valores de  $A_{m\acute{a}x}$  introducidos en las ecuaciones para el cálculo de los parámetros de la inhibición son inferiores a los reales dando como resultado valores de  $IC_{50}$  superiores. Además, al comparar ambos inhibidores se observa que el espaciador no afecta a la interacción con la lectina o incluso mejora su afinidad (probablemente debido a la presencia del 1,2,3-triazol como se explicó con anterioridad). Así, frente a Gal-1C3S y Gal-8S, el inhibidor **58** presenta mayor afinidad que la lactosa (menor valor de  $IC_{50}$ ) por lo que desplaza antes al ligando del sitio de unión de las galectinas. A partir de los experimentos de competición con los distintos inhibidores monovalentes se estimaron de forma indirecta los valores de la constante de disociación  $K_D$  (ver Capítulo 4, Ecuación 4.12) del glico-POSS **56** frente a las galectinas ensayadas obteniéndose así una mayor afinidad por Gal-8S (3-7  $\mu$ M) seguida de Gal-3 (24-26  $\mu$ M) y con menor afinidad por Gal-1C3S. Estos valores se comparan bien con los obtenidos en el ensayo de valoración directa (Figura 5.7 y Tabla 5.3).

**Tabla 5.5** Valores de  $IC_{50}$ ,  $K_i$  y  $K_D$  obtenidos a partir de los experimentos de inhibición con lactosa o LacTEGBu **58** de la complejación del glico-POSS **56** (0.1  $\mu$ M) frente a Gal-1C3S (50  $\mu$ M), Gal-3 (25  $\mu$ M) o Gal-8S (25  $\mu$ M) en HEPES a pH 7.4 y t.a.

	Gal-1C3S		Gal-3		Gal-8S	
	Lactosa	<b>58</b>	Lactosa	<b>58</b>	Lactosa	<b>58</b>
$A_0$ (mA)	152.9	156.2	160.7	170	283.8	259.4
$A_{m\acute{a}x}$ (mA)	105.7	100.1	90.0	92.64	105.2	107.2
$K_i$ ( $\mu$ M)	944	293	93	115	29	51
$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	1878	618	200	253	306	248
$K_D$ ( $\mu$ M)	52	50	26	24	3	7

Como se comentó en la Figura 5.9, fue necesario despreciar los últimos puntos de las curvas de competición con la lactosa modelo **58**, ya que se observaba un aumento del valor de

la anisotropía para altas concentraciones de este inhibidor. Como sabemos, el aumento de anisotropía está directamente relacionado con una menor movilidad de la especie marcada fluorescentemente. Puesto que el inhibidor **58** no está marcado fluorescentemente, parece que se debe de estar produciendo algún tipo de interacción entre éste y el glico-POSS **56** desplazado del sitio de unión de la lectina. Para estudiar este efecto, se llevó a cabo un experimento en ausencia de lectina a concentración fija de ligando multivalente **56** y concentraciones crecientes del inhibidor. Este experimento se realizó tanto con lactosa como con **58** (Figura 5.10).



**Figura 5.10** Curva de valoración de anisotropía de fluorescencia de la interacción entre el glico-POSS **56** (0.1  $\mu$ M) y concentraciones crecientes de lactosa (azul) o lactósido modelo **58** (rojo) en tampón HEPES a pH 7.4 y temperatura ambiente.

La Figura 5.10 muestra que se produce un aumento brusco de la anisotropía a concentraciones de **58** superiores a 0.140 mM, un comportamiento que recuerda a los procesos de formación de micelas. Cuando se realizó el mismo experimento con lactosa, el valor de anisotropía permanecía constante. De la estructura del compuesto **58**, que contiene una cadena terminada en un grupo 1-butil-1*H*-1,2,3-triazol, podemos inferir que el compuesto podría formar micelas en medio acuoso a partir de una concentración determinada (cmc = concentración micelar crítica). Sin embargo, aunque se formaran micelas de **58** en el medio, no deberían afectar al valor de la anisotropía a menos que se esté produciendo algún tipo de interacción con el glico-POSS fluorescente. Como se verá en el capítulo siguiente, los propios glico-POSS tienden a formar agregados en medio acuoso, de forma que si las micelas de **58** interaccionan con los agregados de glico-POSS **56** o bien se incorporan a éstos, el movimiento de los agregados se ralentizaría de forma significativa, lo que se traduciría directamente en un incremento del valor de la anisotropía. De ser válida la hipótesis propuesta, el punto de

inflexión que se produce a 0.140 mM coincidiría aproximadamente con el valor de la concentración micelar crítica (cmc) de **58**, que no hemos medido.

### 5.3 Conclusiones

- 1) Se ha desarrollado una estrategia general de grupos protectores para la síntesis de glico-POSS utilizando el grupo trietilsililo que se puede introducir muy fácilmente y con altos rendimientos y permite la desprotección final de los grupos hidroxilo de forma muy eficiente en condiciones ácidas suaves y sin afectar a la estructura de silsesquioxano. Esta nueva estrategia se ha aplicado con éxito a la síntesis de nuevos glico-POSS funcionalizados con D-galactosa y con el disacárido lactosa y sus correspondientes análogos marcados fluorescentemente con una unidad de BODIPY en el POSS.
- 2) Hemos estudiado la interacción de estos glico-POSS con una serie de lectinas de origen humano con alto interés biomédico que reconocen específicamente  $\beta$ -D-galactopiranosas (galectina-1C3S, galectina-3 y galectina-8S), empleando para ello anisotropía de fluorescencia. Los nuevos glico-POSS han mostrado una afinidad mejorada por estas galectinas gracias al efecto multivalente. Los glico-POSS funcionalizados con lactosa presentan constantes de afinidad  $K_D$  con valores entre 17 y 60  $\mu$ M por estas galectinas, lo que resulta de interés biomédico dadas las implicaciones de estas proteínas en procesos de regulación del sistema inmune y del cáncer. Los glico-POSS funcionalizados con galactosa son en general ligandos pobres de las galectinas ensayadas ( $K_D > 200 \mu$ M), aunque presentan afinidades por estas lectinas 1-2 órdenes de magnitud mejores que la del ligando monovalente (Me- $\beta$ -D-Gal).

### 5.4 Parte Experimental

#### 5.4.1 Materiales y métodos

Además de los materiales y métodos descritos en los capítulos anteriores (3 y 4) se emplearon los que se detallan a continuación.

##### *Análisis Elemental*

Los análisis elementales se efectuaron con los analizadores *Perkin-Elmer 240C* y *Herans CHN-O-Rapid*. Los datos calculados y observados se expresan en tantos por ciento.

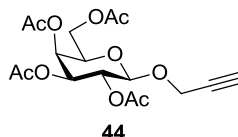


### ***Espectroscopía de Infrarrojo***

Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR Spectrum One y las frecuencias ( $\nu$ ) de los máximos de las bandas más significativas se indican en  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros se realizaron en película fina entre cristales de NaCl.

### **5.4.2 Síntesis de los alquínil-derivados de $\beta$ -D-galactosa para las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino**

#### **2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-galactopiranosido de 2-propinilo (**44**)**

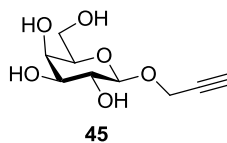


A una disolución de  $\beta$ -D-galactosa peracetilada **43** (1.2 g, 3.07 mmol) y alcohol propargílico (0,275 mL, 4.61 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL), se añadió  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (0,585 mL, 4.61 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4.5 h. La mezcla de reacción se neutralizó con  $\text{Et}_3\text{N}$  y se concentró a sequedad. El crudo se disolvió en  $\text{AcOEt}$ , se lavó con una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (s), se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía flash en columna (hexano/ $\text{AcOEt}$  5:1 con gradiente de polaridad hasta 3:2) para dar **44** como un aceite incoloro (1.131 g, 95%).

**$^1\text{H}$  RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.96 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.46 (t, 1H,  $J_{3'-1'} = 2.4$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CCH}$ ), 3.91 (td, 1H,  $J_{5-4} = 1.1$ ,  $J_{5-6} = 6.6$  Hz,  $H-5$ ), 4.03-4.21 (m, 2H,  $H-6$ ), 4.35 (d, 2H,  $J_{1'-3'} = 2.4$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{CCH}$ ), 4.71 (d, 1H,  $J_{1-2} = 7.9$  Hz,  $H-1$ ), 5.03 (dd, 1H,  $J_{3-2} = 10.4$ ,  $J_{3-4} = 3.4$  Hz,  $H-3$ ), 5.19 (dd, 1H,  $J_{2-3} = 10.4$ ,  $J_{2-1} = 7.9$  Hz,  $H-2$ ), 5.37 (dd, 1H,  $J_{4-3} = 3.4$ ,  $J_{4-5} = 1.1$  Hz,  $H-4$ ).

**$^{13}\text{C}$  RMN** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 20.8 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 20.9 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 21.0 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 56.1 ( $\text{OCH}_2\text{CCH}$ ), 61.4 (C-6), 67.2 (C-4), 68.7 (C-2), 71.08 (C-3, C-5), 75.6 ( $\text{OCH}_2\text{CCH}$ ), 78.4 ( $\text{OCH}_2\text{CCH}$ ), 98.8 (C-1), 169.8 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 170.3 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 170.4 ( $\text{OCOCH}_3$ ), 170.6 ( $\text{OCOCH}_3$ ).

**β-D-galactopiranosido de propargilo (45)**



A una disolución de **44** (0.923 g, 2.39 mmol) en MeOH (20 mL) se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 mg, 0.03 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se neutralizó con resina Amberlita IR-120H<sup>+</sup> previamente lavada (3 × MeOH → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> → MeOH → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), se filtró y se evaporó a sequedad para dar **45** (0.468 g, 90%) como un sólido blanco.

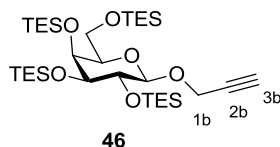
$[\alpha]_D^{22} = -62.8$  ( $c = 0.92$ , CHCl<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 2.84 (t, 1H,  $J_{3-1'} = 2.4$  Hz, OCH<sub>2</sub>CCH), 3.41-3.57 (m, 3H, H-5, H-2, H-3), 3.64-3.79 (m, 2H, H-6), 3.82 (dd, 1H,  $J = 3.1$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, H-4), 4.40 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz, H-1), 4.40 (d, 2H,  $J = 2.3$  Hz, OCH<sub>2</sub>CCH).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 56.5 (OCH<sub>2</sub>CCH), 62.4 (C-6), 70.2 (C-4), 72.2 (C-5), 74.8 (C-3), 76.1 (OCH<sub>2</sub>CCH), 76.8 (C-2) 80.1 (OCH<sub>2</sub>CCH), 102.6 (C-1).

EM-ESI ( $m/z$ ): 241 [M+Na]<sup>+</sup>.

**2,3,4,6-Tetraquis-O-(triethylsilyl)- β-D-galactopiranosido de propargilo (46)**



A una disolución del β-D-galactósido **45** (93 mg, 0.426 mmol), imidazol (351.7 mg, 5.114 mmol) y DMAP (0.5 mg, 0.004 mmol) en DMF anhidra (5 mL) bajo argón, a 0 °C, se añadió cloruro de trietilsilano (0.44 mL, 2.557 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se dejó atemperar lentamente y se agitó durante 24 h a t.a. Transcurrido este tiempo, se añadió H<sub>2</sub>O (20 mL) y AcOEt (20 mL) y se extrajo la fase acuosa con AcOEt (5 × 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de CuSO<sub>4</sub> (2 × 25 mL) y con disolución saturada de NaCl (25 mL) y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (s), se filtraron y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía flash en columna de SiO<sub>2</sub> previamente desactivada (tratándola con el eluyente conteniendo un 5% de

triethylamina), empleando hexano/AcOEt 50:1 para obtener **46** (228 mg, 79 %) como un aceite incoloro.

$$[\alpha]_D^{22} = -17.11 \text{ (} c = 1.83 \text{ (g/100 mL), acetona)}$$

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.47-0.72 (m, CH<sub>3</sub> OTES), 0.89-1.01 (m, CH<sub>2</sub> OTES), 2.39 (t, *J* = 2.5 Hz, *H*-3b), 3.33-3.39 (m, 1H, *H*-3a), 3.44 (dd, 1H, *J* = 9.2 *J* = 2.3 Hz, *H*-5a), 3.60-3.79(m, 3H, *H*-6a, *H*-6a' y *H*-2a), 3.89 (s, 1H, *H*-4a), 4.30 (s.a, 1H, *H*-1a)\*, 4.31 (dd, 1H, *J*<sub>AB</sub> = 15.7 *J* = 2.5 Hz, *H*-1b), 4.38 (dd, 1H, *J*<sub>AB</sub> = 15.6 *J* = 2.5 Hz, *H*-1b').

\*El valor inusual de la constante de acoplamiento vecinal <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H de los hidrógenos del anillo de piranosa (la señal de H<sub>1</sub> del anillo de β-D-galactopiranososa aparece como singlete) muestra que estas moléculas se encuentran en equilibrio conformacional <sup>4</sup>C<sub>1</sub> ↔ <sup>1</sup>C<sub>4</sub>, como se había descrito previamente en derivados similares con sustituyentes sililados muy voluminosos.<sup>[30]</sup>

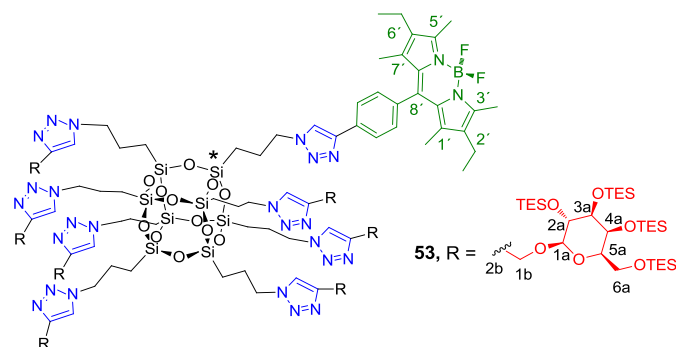
<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ: 4.5, 4.6, 4.9, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 6.3, 6.6, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2 y 7.3 (OTES), 55.5 (C1b) 62.0 (C-6a) 71.7 y 72.1 (C-4a y 2a), 74.7 (OCH<sub>2</sub>CCH), 76.1 y 76.2 (C-5a y 3a), 79.3 (OCH<sub>2</sub>CCH), 101.7 (C1a),

EM-ESI (*m/z*): 697.5 [M+Na]<sup>+</sup>.

IR (KBr): ν (cm<sup>-1</sup>) = 3412, 3302 (st C≡C-H), 3018, 2955.4, 2395, 1462, 1413, 1215, 1106 (st Si-O-C), 1070, 1007, 773, 746, 669.

### 5.4.3 Síntesis de los glico-POSS de β-D-galactosa marcados con sonda fluorescente

#### Glico-POSS 53



**Método B.** En un tubo de vidrio para microondas provisto con tapón de teflón se introdujo, bajo atmósfera de argón, una disolución de azido-POSS-BDP **7** (13 mg, 8.7 μmol),

**46** (57.5 mg, 0.087 mmol), catalizador Cu-tren (1.6 mg, 0.87  $\mu$ mol) y *i*Pr<sub>2</sub>NEt (30  $\mu$ L, 0.174 mmol) en tolueno (1.5 mL). La mezcla de reacción se calentó en un reactor de microondas focalizadas a 80 °C durante 11 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se purificó el crudo por cromatografía flash en columna de SiO<sub>2</sub>, previamente desactivada con un 1% de trietilamina, empleando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y un gradiente de polaridad creciente hasta CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1, para obtener **53** (43.6 mg, 81%) como un aceite rojo. En algunas fracciones se observaron por <sup>1</sup>H RMN restos de sales de trietilamonio que fueron eliminadas mediante extracción con una disolución acuosa diluida de NaHCO<sub>3</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

$[\alpha]_D^{22} = +35.07$  ( $c = 0.83$ , acetona)

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0.43-0.75 (m, 268 H, CH<sub>3</sub> OTES y Si-CH<sub>2</sub>), 0.81-1.04 (m, 174H, CH<sub>2</sub> OTES y CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub> BDP), 1.34 (s, 6H, CH<sub>3</sub> BDP en C1' y C7'), 1.95-2.12 (m, 16H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.29 (dd, 4H,  $J = 14.9$   $J = 7.4$  Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub> BDP), 2.53 (s, 6H, CH<sub>3</sub> BDP en C3' y C5'), 3.53-3.59 (m, 7H, CH 6a), 3.64-3.71 (m, 7H, CH 6a'), 3.76-3.85 (m, 7H, CH 5a), 3.96 (dd, 7H,  $J = 4.6$   $J = 4.0$  Hz, CH 3a), 3.99-4.04 (m, 7H, CH 2a), 4.11 (dd, 7H,  $J = 14.9$   $J = 7.4$  Hz, CH 4a) 4.24-4.37 (m, 14H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.37-4.46 (m, 2H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>\*), 4.54-4.68 (m, 7H, CH<sub>2</sub> 1b), 4.54-4.68 (dd, 7H,  $J = 12.4$   $J = 4.3$  Hz, CH<sub>2</sub> 1b'), 4.92 (s, 7H, CH 1a), 7.32 (d, 2H,  $J_{AB} = 7.3$  Hz, 2 $\times$  CH fenilo), 7.55 (s, 4H, CH triazol), 7.57 (s, 3H, CH triazol), 8.03 (d, 2H,  $J_{AB} = 8.0$  Hz, 2 $\times$  CH fenilo), 8.29 (s, 1H, CH triazol\*).

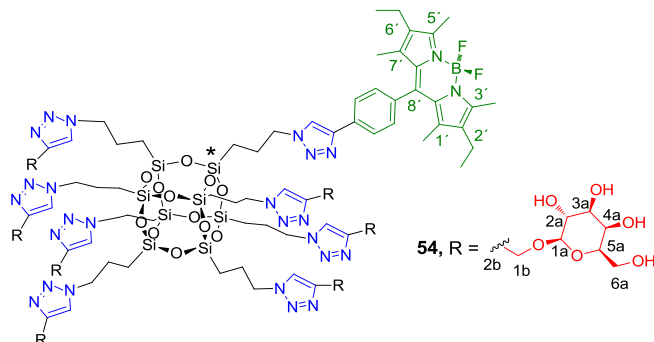
Los grupos OTES se desprotegen con facilidad, por lo que las integrales de las señales correspondientes a estos grupos son algo inferiores a lo esperado porque hay desprotección parcial durante el aislamiento del compuesto o bien en la preparación de la muestra de RMN, como se aprecia también en el espectro de <sup>13</sup>C RMN.

<sup>13</sup>C RMN (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4.4, 4.5, 4.7, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 8.8 (SiCH<sub>2</sub>), 9.0 (CH<sub>2</sub>Si\*), 12.0 (CH<sub>3</sub> BDP en C1' y C7'), 12.6 (CH<sub>3</sub> BDP en C3' y C5'), 14.8 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub> BDP), 17.2 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub> BDP), 24.0 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 24.3(SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>\*), 52.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>\*), 61.2 (CH<sub>2</sub> 1b), 64.5 (CH<sub>2</sub> 6a), 73.4 (CH 5a), 79.3 (CH 4a), 84.3 (CH 2a), 84.9 (CH 3a), 107.6 (CH 1a), 121.0 (CH triazol\*), 122.9 (CH triazol  $\times 4$ ), 123.0 (CH triazol  $\times 3$ ), 126.3 (CH Ar), 128.9 (CH Ar), 130.9, 131.6, 132.9, 135.5, 138.5, 140.0 (C Ar), 145.3 (C triazol), 147.1 (C Ar), 153.8 (C triazol\*)

<sup>29</sup>Si RMN (79.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  -67.28, -67.34, -67.36.

**MALDI-TOF** (matriz: ácido 2,5-dihidroxibenzoico)  $m/z$ : 6238  $[M+H_2O]^+$  Se aprecia un patrón de picos distanciados 115 unidades de masa que corresponde a la pérdida de trietilsilanos por contacto con la matriz ácida.

#### Glico-POSS 54



Se disolvió el compuesto **53** (50 mg, 8.06  $\mu\text{mol}$ ) en 1.5 mL de AcOH acuoso al 80% junto con 0.3 mL de MeOH y 0.1 mL de hexano para disolver completamente el producto. Se agitó vigorosamente a t.a. durante 15 h, posteriormente se diluyó con 1 mL de  $H_2O$  y se liofilizó. Para eliminar por completo los subproductos sililados (hexametildisiloxano, observado en el espectro de  $^1H$  RMN) el producto liofilizado se disolvió en una mezcla MeOH/AcOH 80% (1:1 v/v) y se eliminó el disolvente a presión reducida a 36  $^{\circ}C$  para dar **54** (23.6 mg, 97%) como un sólido amorfo rojo.

**$^1H$  RMN** (500 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  0.54-0.67 (m, 14H,  $Si-CH_2$ ), 0.67-0.77 (m, 2H,  $Si^*-CH_2$ ) 0.94-1.06 (m, 6H,  $CH_3CH_2$  BDP), 1.39 (s, 6H,  $CH_3$  BDP en C1' y C7'), 1.86-2.03 (m, 16H,  $SiCH_2CH_2$ ), 2.39 (q, 4H,  $J = 7.4$  Hz,  $CH_3CH_2$  BDP), 2.49 (s, 6H,  $CH_3$  BDP en C3' y C5'), 3.43-3.53 (m, 7H,  $CH$  4a), 3.53-3.61 (m, 14H,  $CH$  2a y  $CH$  5a), 3.68-3.82 (m, 14H,  $CH_2$  6aa'), 3.82-3.87 (m, 7H,  $CH$  3a) 4.32-4.44 (m, 21H,  $7 \times SiCH_2CH_2CH_2$  y  $7 \times CH$  1a), 4.45-4.52 (m, 2H,  $SiCH_2CH_2CH_2^*$ ), 4.98 (dd, 14H,  $J = 12.4$  Hz,  $J = 1.8$  Hz  $CH_2$  1b), 7.43 (d, 2H,  $J_{AB} = 8.4$  Hz,  $2 \times CH$  fenilo), 8.02 (s, 4H,  $CH$  triazol), 8.03 (s, 3H,  $CH$  triazol), 8.06 (d, 2H,  $J_{AB} = 8.4$  Hz,  $2 \times CH$  fenilo), 8.51 (s, 1H,  $CH$  triazol\*).

**$^{13}C$  RMN** (125 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  9.3 ( $SiCH_2$ ), 9.4 ( $CH_2Si^*$ ), 12.3 ( $CH_3$  BDP en C1' y C7'), 12.6 ( $CH_3$  BDP en C3' y C5'), 15.0 ( $CH_3CH_2$  BDP), 17.8 ( $CH_3CH_2$  BDP), 23.7 ( $SiCH_2CH_2$ ), 53.2 ( $SiCH_2CH_2CH_2$ ), 53.5 ( $SiCH_2CH_2CH_2^*$ ), 62.6 ( $CH_2$  6a), 63.1 ( $CH_2$  1b), 70.3 ( $CH$  3a), 72.5 ( $CH$  5a), 74.9 ( $CH$  4a), 76.8 ( $CH$  2a), 104.3 ( $CH$  1a), 123.1 ( $CH$  triazol\*), 125.6 ( $CH$

triazol), 127.5 (CH Ar), 130.3 (CH Ar), 131.9, 132.7, 134.1, 136.7, 139.6, 141.6 (C Ar), 145.8 (C triazol), 148.0 (C Ar), 150.4 (C triazol\*)

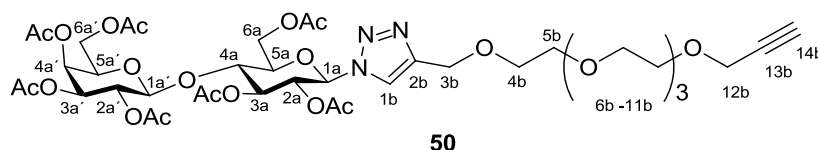
$^{29}\text{Si}$  RMN (79.5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  -66.65.

**MALDI-TOF** (matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: 3044  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

#### 5.4.4 Síntesis de los alquínil-derivados de lactosa para las reacciones de cicloadición 1,3-dipolar azida-alquino

Los compuestos **47** y **48** se prepararon siguiendo uno de los procedimientos descritos,<sup>[19]</sup> al igual que el compuesto **49**.<sup>[20]</sup>

#### Compuesto 50



**Método A:** A una disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (26 mg, 0.104 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (19 mL) se añadió, bajo atmósfera de Ar, una disolución de ascorbato sódico (65 mg, 0.327 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (19 mL). A continuación se añadió a t.a. una disolución de la azida **48** (1.080 g, 1.633 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (19 mL) seguida de una disolución del diino **49** (1.766 g, 6.534 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (19 mL). Tras agitar la mezcla vigorosamente a t.a. durante 30 h, se adicionó una disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (26 mg, 0.104 mmol) y ascorbato sódico (65 mg, 0.327 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (4 mL) y se agitó 24 h más hasta completar la reacción. Posteriormente se adicionó una disolución saturada de EDTA (40 mL) y se agitó vigorosamente durante 30 min. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 25$  mL). El conjunto de fases orgánicas se lavó con disolución acuosa saturada de NaCl (40 mL), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (s), se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía flash en columna empleando hexano/AcOEt 5:1 en gradiente de polaridad hasta 100% AcOEt para dar **50** como un aceite incoloro (1.242 g, 94 %).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.83 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  OAc), 1.93 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  OAc), 2.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  OAc), 2.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  OAc), 2.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  OAc), 2.07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  OAc), 2.21 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  OAc), 2.41 (t, 1H,  $J = 2.4$  Hz,  $\equiv\text{CH}$  14b), 3.58-3.68 (m, 16H,  $4 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.85-3.96 (m, 3H,  $\text{CH}$  3a, 4a y 5a), 4.03-4.14 (m, 3H,  $\text{CH}_2$  6a y  $\text{CHH6a}$ ), 4.15-4.18 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  12b), 4.44 (dd, 1H,  $J = 12.5$ ,  $J = 2.0$  Hz,  $\text{CHH6a}$ ), 4.50 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz,  $\text{CH}$  1a), 4.64 (s, 2H,  $\text{CH}_2$

3b), 4.94 (dd, 1H,  $J = 10.5$ ,  $J = 3.6$  Hz, CH 3a'), 5.10 (dd, 1H,  $J = 10.5$ ,  $J = 7.8$  Hz, CH 2a'), 5.33 (d, 1H,  $J = 3.6$  Hz, CH 4a'), 5.33 (d, 1H,  $J = 8.5$  Hz, CH 5a'), 5.35-5.38 (m, 1H, CH 2a), 5.75-5.85 (m, 1H, CH 1a), 7.72 (s, 1H, CH triazol 1b).

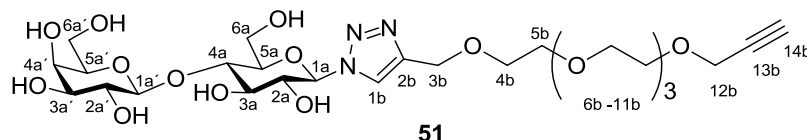
$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20.3, 20.3, 20.7 ( $\times 3$ ), 21.1, 20.9, 21.1 ( $7 \times \text{CH}_3 \text{ OAc}$ ), 58.4 (CH<sub>2</sub> 1b), 60.9 (CH<sub>2</sub> 6a), 61.8 (CH<sub>2</sub> 6a'), 64.6 (CH<sub>2</sub> 3b), 66.6 (CH 4a'), 69.1 (CH 2a'), 69.1, 69.6, 70.4, 70.5, 70.6, 70.9, 71.0, 72.7 (CH 3a'), 74.6 (CH 5a'), 74.7 ( $\equiv\text{CH}$  14b), 75.7, 75.9, 79.7, 85.5 (CH 1a), 101.2 (CH 1a'), 121.2 (CH triazol 1b), 145.8 (C 2b), 169.1 (C OAc), 169.2 (C OAc), 169.6 (C OAc), 170.1 (C OAc), 170.2 (C OAc), 170.3 (C OAc), 170.4 (C OAc).

**EM-ESI** ( $m/z$ ): 932.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 954.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**Análisis elemental** (%) Calculado para  $\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_{22}$  (931.9): C, 51.55; H, 6.17; N, 4.51. Encontrado: C 49.62; H, 6.00; N, 3.68.

**IR** (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3484, 3275 (st  $\text{C}\equiv\text{C-H}$ ), 3145, 3013, 2873, 2116, 1745 (st  $\text{C=O}$ ), 1645, 1455 (st  $\text{N=N}$ ), 1370, 1228 (st  $\text{CO-O}$ ), 1088 (st  $\text{C-C-O}$ ), 954, 921, 841, 755, 666.

### Compuesto 51



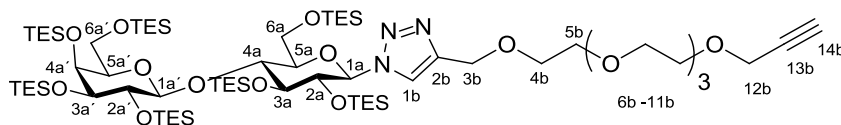
A una disolución de **50** (650 mg, 0.698 mmol) en MeOH (15 mL) se añadió, bajo atmósfera de Ar,  $\text{H}_2\text{O}$  (3 mL) y trietilamina (2.96 mL, 20.925 mmol) y se agitó a t.a. durante 18 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida para obtener el compuesto **51** (337 mg, 76%) que se utilizó sin purificación posterior.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  2.98 (t, 1H,  $J = 2.2$  Hz,  $\equiv\text{CH}$  14b), 3.43-3.76 (m, 20H,  $4 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.76-3.88 (m, 4H), 3.88-4.00 (m, 3H), 4.05 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 4.21 (d, 2H,  $J = 2.3$  Hz, CH<sub>2</sub> 12b), 4.49 (d, 1H,  $J = 6.8$  Hz, CH 1a'), 4.69 (s, 2H, CH<sub>2</sub> 3b), 4.97 (s.a., 7H, OH), 5.72 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz, CH 1a), 8.28 (s, 1H, CH triazol 1b).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  59.8, 61.3, 62.3, 64.6, 69.8, 69.9, 70.5, 70.9, 71.1, 72.3, 73.3, 74.4, 76.4, 76.8, 79.1, 79.7, 80.7, 88.8 (CH 1a), 104.7 (CH 1a'), 124.5 (CH triazol 1b), 145.7 (C 2b).

**EM-ESI** ( $m/z$ ): 638.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 660.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

## Compuesto 52



## 52

A una disolución de **51** (149 mg, 0.234 mmol), imidazol (242 mg, 3.505 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP (0.3 mg, 0.002 mmol) en DMF (2mL), se añadió cloruro de trietilsilano (0.4 mL, 2.336 mmol) bajo atmósfera de Ar a 0 °C. Tras agitar la mezcla de reacción a t.a 20 h, se añadió H<sub>2</sub>O (10 mL) y la mezcla se extrajo con AcOEt (4 × 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de CuSO<sub>4</sub> (2 × 15 mL), con disolución saturada de NaCl (20 mL) y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (s), se filtraron y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía flash en columna de SiO<sub>2</sub> previamente desactivada con un 5% de trietilamina, empleando hexano/AcOEt 2:1 para obtener **52** (183 mg, 54%) como un aceite incoloro.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, acetona-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.18-1.32 (m, 105 H, 7× OTES), 2.91 (t, 1H,  $J$  = 2.4 Hz,  $\equiv$ CH 14b), 3.35 (dd, 1H,  $J$  = 8.8,  $J$  = 5.3 Hz, CH 3a'), 3.51 (dd, 1H,  $J$  = 9.3,  $J$  = 2.4 Hz, CH 5a'), 3.58-3.71 (m, 20 H, 4× OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O, CH, CH<sub>2</sub> 6a y CHH 6a'), 3.81-3.91 (m, 4 H, 3× CH y CHH 6a'), 4.01-4.08 (m, 1H, CH 4a'), 4.18 (d, 2H,  $J$  = 2.4 Hz, CH<sub>2</sub> 12b), 4.13-4.23 (m, 1H, CH 2a), 4.56 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz, CH 1a'), 4.80 (s, 2H, CH<sub>2</sub> 3b), 5.73 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, CH 1a), 8.13 (s, 1H, CH triazol 1b).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, acetona-d<sub>6</sub>):  $\delta$  5.1, 5.1, 5.4, 5.8, 5.9, 6.0, 6.0, 6.1, 6.2, 6.4, 6.5, 7.0, 7.1, 7.1, 7.3, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 58.6 (CH<sub>2</sub> 1b), 61.4 (CH<sub>2</sub> 6a'), 64.8 (CH<sub>2</sub> 3b), 69.8, 70.2, 71.0, 71.2, 71.2, 71.3, 72.3, 72.7, 75.2 (CH 2a), 75.7 (CH 3a'), 76.2 (CH 5a'), 76.3, 77.6, 78.1, 78.5, 80.9, 89.2 (CH 1a), 103.6 (CH 1a'), 124.1 (CH triazol 1b), 146.0 (C 2b).

EM-ESI ( $m/z$ ): 1438.8 [M+H]<sup>+</sup>, 1460.7 [M+Na]<sup>+</sup>.

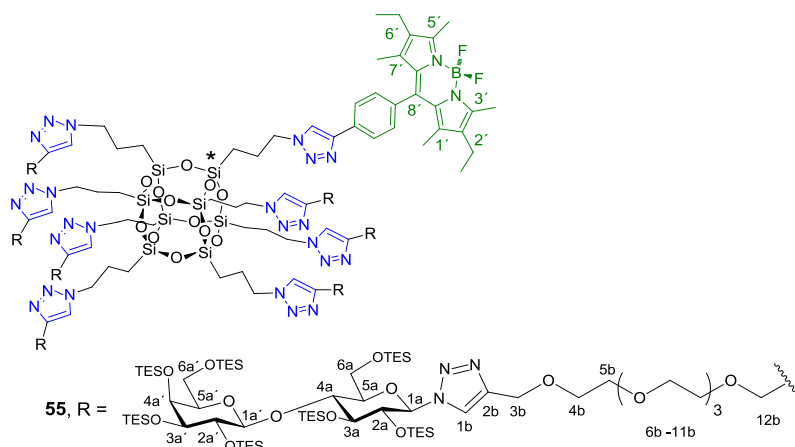
Análisis elemental (%) Calculado para C<sub>68</sub>H<sub>141</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub>Si<sub>7</sub> (1437.4): C, 56.82; H, 9.89; N, 2.92. Encontrado: C, 56.53; H, 10.18; N, 2.71.

IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 3312, 3257 (st C $\equiv$ C-H), 2954, 2912, 2877, 1458, 1414, 1378, 1352, 1303, 1287, 1240, 1166, 1100 (st Si-O-C), 1042, 1007, 970, 927, 898, 867, 826, 739 (st Si-C).



### 5.4.5 Síntesis de los glico-POSS de lactosa marcados con sonda fluorescente

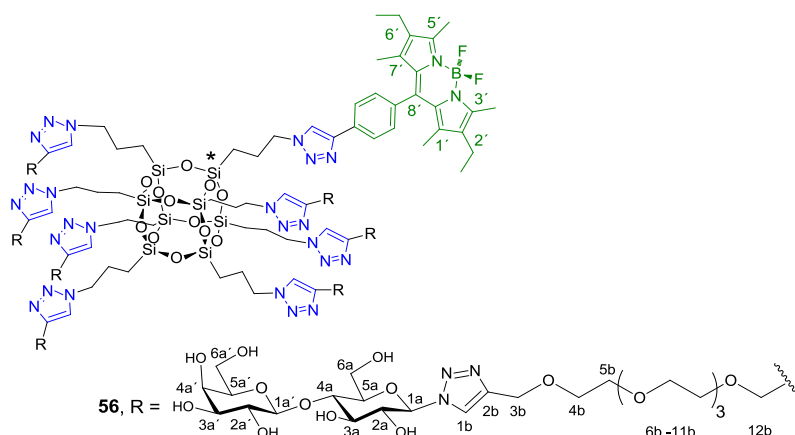
#### Glico-POSS 55



**Método B.** A una disolución de azido-POSS-BDP **7** (20 mg, 11.3  $\mu\text{mol}$ ) y **52** (163 mg, 0.113 mmol) en tolueno (3 mL) se añadió el catalizador Cu-tren (10 mg, 5.6  $\mu\text{mol}$ ) y  $i\text{Pr}_2\text{NEt}$  (32  $\mu\text{L}$ , 0.181 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se calentó a 120  $^{\circ}\text{C}$  durante 20 horas. Se eliminó el disolvente a presión reducida para obtener un aceite rojo que se utilizó sin purificación posterior en la siguiente reacción.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, acetona- $d_6$ ):  $\delta$  0.13-1.19 (m, 757 H,  $7\times 7$  OTES,  $8\times \text{SiCH}_2$ ,  $2\times \text{CH}_3\text{CH}_2$  BDP), 1.43 (s, 6H,  $\text{CH}_3$  BDP C1' y C7'), 2.07-2.19 (m, 16H,  $8\times \text{SiCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.32-2.44 (m, 4H,  $2\times \text{CH}_3\text{CH}_2$  BDP), 2.51 (s, 6H,  $\text{CH}_3$  BDP C3' y C5'), 3.35 (dd, 7H,  $J = 8.7$ ,  $J = 5.2$  Hz), 3.44-3.76 (m, 140H,  $7\times 4$   $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.77-3.95 (m, 43H), 4.05 (d, 7H,  $J = 1.6$  Hz), 4.09-4.26 (m, 14H,  $7\times \text{CH}_2$ ), 4.40 (t, 14H,  $J = 6.5$  Hz,  $7\times \text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4.57 (d, 9H,  $J = 7.6$  Hz,  $7\times \text{CH}$  1a' y  $\text{Si}^*\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4.53 (dd, 14H,  $J = 5.4$ ,  $J = 1.2$  Hz  $7\times \text{CH}_2$ ), 5.78 (d, 7H,  $J = 8.4$  Hz,  $7\times \text{CH}$  1a), 7.47 (d, 2H,  $J_{AB} = 8.2$  Hz, Ar BDP), 7.94 (s, 1H, CH triazol), 7.96 (s, 3H,  $3\times \text{CH}$  triazol), 7.97 (s, 3H,  $3\times \text{CH}$  triazol), 8.14 (s, 3H,  $3\times \text{CH}$  triazol 1b), 8.114 (s, 4H,  $4\times \text{CH}$  triazol 1b), 8.63 (s, 1H, CH triazol BDP).

## Glico-POSS 56



Se disolvió el compuesto **55** (212 mg, 18.3  $\mu$ mol) en THF (1 mL) y se añadió AcOH acuoso al 80% (4.8 mL) junto con hexano (1 mL) para facilitar la disolución del compuesto. Tras agitar la disolución vigorosamente a t.a. durante 22 h, se eliminó el disolvente a presión reducida, el crudo resultante se diluyó con MeOH (30 mL) y se extrajo con hexano ( $2 \times 15$  mL). Se eliminó el disolvente de la fase metanólica a presión reducida y se purificó el residuo por cromatografía de exclusión sobre gel con Sephadex® LH-20 empleando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  1:10 como eluyente para obtener el compuesto **56** (53 mg, 79%) como un aceite rojo muy denso.

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0.46-0.65 (m, 14H,  $8 \times \text{SiCH}_2$ ), 0.65-0.75 (m, 2H,  $\text{Si}^*\text{CH}_2$ ), 0.97(t, 6H,  $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2$  BDP), 1.36 (s, 6H,  $\text{CH}_3$  BDP C1' y C7'), 1.82-2.04 (m, 16H,  $8 \times \text{SiCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.26-2.39 (m, 4H,  $2 \times \text{CH}_3\text{CH}_2$  BDP), 2.48 (s, 6H,  $\text{CH}_3$  BDP C3' y C5'), 3.25 (t, 14H,  $J = 5.0$  Hz,  $7 \times \text{CH}_2$ ), 3.44-3.49 (m, 14H,  $7 \times \text{CH}_2$ ), 3.51-3.73 (m, 123H,  $7 \times 4 \text{ OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ,  $2 \times 7 \text{ CH}$  y  $7 \times \text{CH}$  2a'), 3.71-3.77 (m, 7H,  $\text{CHH}$ ), 3.77-3.85 (m, 21H,  $7 \times \text{CHH}$ ,  $7 \times 2 \text{ CH}$ ), 3.85-3.95 (m, 35H,  $7 \times 2 \text{ CH}_2$ ,  $7 \times \text{CH}$ ), 4.01 (t, 7H,  $J = 8.6$  Hz,  $7 \times \text{CH}$  2a), 4.28-4.46 (m, 16H,  $8 \times \text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 4.46 (d, 7H,  $J = 6.3$  Hz,  $7 \times \text{CH}$  1a'), 4.54-4.73 (m, 14H,  $7 \times \text{CH}_2$ -triazol), 4.87 (s.a., 49H, OH), 5.69 (d, 7H,  $J = 8.6$  Hz,  $7 \times \text{CH}$  1a), 7.40 (s, 1H,  $\text{CH}$  triazol), 7.42 (s, 1H,  $\text{CH}$  triazol), 7.48 (d, 2H,  $J_{AB} = 8.6$  Hz, Ar BDP), 8.05 (s, 5H,  $\text{CH}$  triazol), 8.26 (s.a., 9H, Ar BDP y  $7 \times \text{CH}$  triazol 1b), 8.52 (s, 1H,  $\text{CH}$  triazol BDP).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  9.2 ( $\text{SiCH}_2$ ), 9.5 ( $\text{CH}_2\text{Si}^*$ ), 12.3 ( $\text{CH}_3$  BDP en C1' y C7'), 12.7 ( $\text{CH}_3$  BDP en C3' y C5'), 15.1 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$  BDP), 17.7 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2$  BDP), 24.7 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2$ ), 53.4 ( $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 61.2 ( $\text{CH}_2$  6a), 62.4 ( $\text{CH}_2$  1b), 64.8 ( $\text{CH}_2$ ), 70.1, 70.5, 70.6, 71.1 y 71.2

(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 71.5 (CH<sub>2</sub>), 72.4 (CH), 73.4 (CH 2a), 74.4 (CH), 76.5 (CH), 76.9 (CH), 79.2 (CH), 79.3 (CH), 89.1 (CH 1a), 104.7 (CH 1a'), 124.9 (CH triazol\*), 125.0 (CH triazol), 127.2 (CH triazol), 127.5 (CH triazol), 130.3 (CH Ar), 131.7, 132.3, 133.5, 134.5, 136.5, 137.5, 139.8 (C triazol), 141.4 (C Ar), 143.5, 146.2, 155.1.

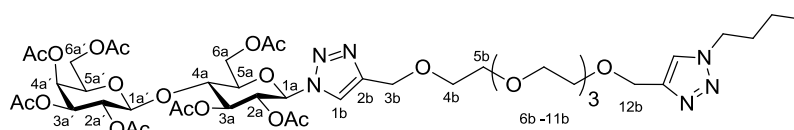
<sup>19</sup>F RMN (376 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ -145.24 a -145.94 (m, 2F, BF<sub>2</sub>).

<sup>29</sup>Si RMN (79.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ -66.56, -65.57.

**MALDI-TOF** (matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico) m/z: 5977 [M+Na]<sup>+</sup>.

#### 5.4.6 Síntesis del modelo monovalente de lactosa **58** para los estudios de interacción con galectinas

##### Compuesto **57**



**57**

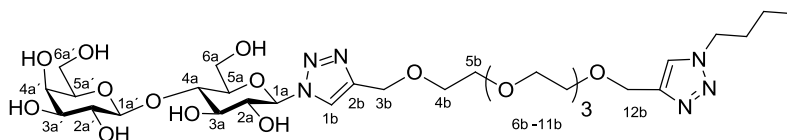
A una disolución de 1-butilazida<sup>[21]</sup> (2.2 mL de disolución ~0.04 M en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ~0.086 mmol) y **52** (80 mg, 0.086 mmol) se añadió una disolución de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (2.1 mg, 8.58 μmol) y ascorbato sódico (17 mg, 0.086 mmol) en H<sub>2</sub>O (2.2 mL). Tras agitar vigorosamente a t.a. durante 3 h, se añadió una disolución acuosa saturada de EDTA (1 mL) y se agitó 30 min. Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×2 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (s), se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía flash en columna (hexano/AcOEt 1:10) para dar **57** (74 mg, 84%) como un aceite incoloro.

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.95 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.35 (dq, 2H, *J* = 14.7, *J* = 7.4 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.81-1.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub> OAc), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub> OAc), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub> OAc), 2.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub> OAc), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub> OAc), 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub> OAc), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub> OAc), 3.58-3.73 (m, 16H, 4× OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.84-4.01 (m, 4H), 4.04-4.20 (m, 4H), 4.34 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.47 (dd, 1H, *J* = 12.2, *J* = 1.7 Hz), 4.53 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, CH 1a), 4.67 (d, 4H, *J* = 4.3 Hz), 4.97 (dd, 1H, *J* = 10.4, *J* = 3.4 Hz, CH 3a'), 5.13 (dd, 1H, *J* = 10.4, *J* = 8.0 Hz CH 2a'), 5.36 (dd, 1H, *J* = 3.4, *J* = 0.8 Hz, CH 4a'), 5.38-5.42 (m, 2H), 5.78-5.86 (m, 1H, CH 1a), 7.56 (s, 1H, CH triazol), 7.74 (s, 1H, CH triazol).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) 19.9, 20.4, 20.6, 20.8, 20.9, 32.4, 50.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 60.9, 61.9, 64.7, 64.8, 66.7, 69.2, 69.8, 70.0, 70.7, 71.0, 72.8, 75.8, 76.0, 85.6 ( $\text{CH}$  1a), 101.3 ( $\text{CH}$  1a'), 121.2 ( $\text{CH}$  triazol), 122.5 ( $\text{CH}$  triazol), 145.3 ( $\text{C}$  triazol), 146.0 ( $\text{C}$  triazol), 169.2 ( $\text{C}$  OAc), 169.6 ( $\text{C}$  OAc), 170.2 ( $2 \times \text{C}$  OAc), 170.3 ( $\text{C}$  OAc), 170.5 ( $2 \times \text{C}$  OAc).

**HRMS (ESI)** calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{67}\text{N}_6\text{O}_{22}$  1031.4308  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , encontrado 1031.4367.

### Compuesto 58



**58**

A una disolución de **57** (50 mg, 0.048 mmol) en MeOH (2 mL) se añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4 mg, 0.03 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se neutralizó con resina Amberlita IR-120H<sup>+</sup> previamente lavada ( $3 \times \text{MeOH} \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{MeOH} \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), se filtró y se evaporó a sequedad para dar **58** (33 mg, 92%) como un aceite denso.

**$^1\text{H}$  RMN** (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0.96 (t, 3H,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.22-1.42 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.70-2.14 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.16 (q, 1H,  $J = 7.3$  Hz), 3.44-3.92 (m, 25H,  $4 \times \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.99 (t, 2H,  $J = 9.0$  Hz), 4.41 (q, 3H,  $J = 7.1$  Hz), 4.64 (d, 4H,  $J = 8.6$  Hz,  $\text{CH}$  1a'), 4.87 (s.a. 7H, OH), 5.66 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz  $\text{CH}$  1a), 7.97 (s, 1H,  $\text{CH}$  triazol), 8.20 (s, 1H,  $\text{CH}$  triazol).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  9.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 13.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 20.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 33.3, 47.7, 51.0, 61.5, 62.5, 64.9, 70.3, 70.7, 71.4, 72.5, 73.6, 74.8, 76.8, 77.1, 79.5, 79.7, 89.3 ( $\text{CH}$  1a), 105.1 ( $\text{CH}$  1a'), 124.3 ( $\text{CH}$  triazol), 125.0 ( $\text{CH}$  triazol), 145.8 ( $\text{C}$  triazol), 146.00 ( $\text{C}$  triazol).

**HRMS (ESI)** calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_{15}$  737.3569  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , encontrado 737.3536; calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{NaO}_{15}$  759.3388  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , encontrado 759.3363.

## Referencias

- [1] V. I. Teichberg, I. Silman, D. D. Beitsch and G. Resheff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, 72, 1383-1387.
- [2] S. H. Barondes, V. Castronovo, D. N. Cooper, R. D. Cummings, K. Drickamer, T. Feizi, M. A. Gitt, J. Hirabayashi, C. Hughes, K. Kasai and a. et, *Cell* **1994**, 76, 597-598.
- [3] D. N. W. Cooper, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2002**, 1572, 209-231.
- [4] G. A. Rabinovich and N. Rubinstein, *Medicina (Buenos Aires, Argent.)* **2001**, 61, 85-92.
- [5] E. Salomonsson, A. Larumbe, J. Tejler, E. Tullberg, H. Rydberg, A. Sundin, A. Khabut, T. Frejd, Y. D. Lobsanov, J. M. Rini, U. J. Nilsson and H. Leffler, *Biochemistry* **2010**, 49, 9518-9532.
- [6] E. Salomonsson, M. C. Carlsson, V. Osla, R. Hendus-Altenburger, B. Kahl-Knutson, C. T. Oeberg, A. Sundin, R. Nilsson, E. Nordberg-Karlsson, U. J. Nilsson, A. Karlsson, J. M. Rini and H. Leffler, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 35079-35091.
- [7] M. F. Troncoso, M. T. Elola, D. O. Croci and G. A. Rabinovich, *Front. Biosci., Scholar Ed.* **2012**, S4, 864-887.
- [8] R. T. Lee and Y. C. Lee, *Glycoconj J* **2000**, 17, 543-551.
- [9] S. Carlsson, C. T. Oeberg, M. C. Carlsson, A. Sundin, U. J. Nilsson, D. Smith, R. D. Cummings, J. Almkvist, A. Karlsson and H. Leffler, *Glycobiology* **2007**, 17, 663-676.
- [10] a) M. Salatino and G. A. Rabinovich, *Methods Mol. Biol. (N. Y., NY, U. S.)* **2011**, 677, 355-374; b) V. L. Thijssen, G. A. Rabinovich and A. W. Griffioen, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2013**, 24, 547-558; c) A. U. Newlaczyl and L.-G. Yu, *Cancer Lett. (N. Y., NY, U. S.)* **2011**, 313, 123-128; d) K. Ito, K. Stannard, E. Gabutero, A. M. Clark, S.-Y. Neo, S. Onturk, H. Blanchard and S. J. Ralph, *Cancer Metastasis Rev.* **2012**, 31, 763-778; e) N. E. Reticker-Flynn, D. F. B. Malta, M. M. Winslow, J. M. Lamar, M. J. Xu, G. H. Underhill, R. O. Hynes, T. E. Jacks and S. N. Bhatia, *Nat Commun* **2012**, 3, 1122.
- [11] F.-T. Liu and G. A. Rabinovich, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, 1183, 158-182.
- [12] a) G. A. Rabinovich, Y. van Kooyk and B. A. Cobb, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, 1253, 1-15; b) G. Radosavljevic, V. Volarevic, I. Jovanovic, M. Milovanovic, N. Pejnovic, N. Arsenijevic, D. K. Hsu and M. L. Lukic, *Immunol. Res.* **2012**, 52, 100-110; c) S. Sato, M. Ouellet, C. St-Pierre and M. J. Tremblay, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, 1253, 133-148.
- [13] R. G. Lichtenstein and G. A. Rabinovich, *Cell Death Differ.* **2013**, 20, 976-986.
- [14] a) C. F. Brewer, M. C. Miceli and L. G. Baum, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 616-623; b) O. B. Garner and L. G. Baum, *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, 36, 1472-1477.
- [15] a) C. T. Oeberg, H. Leffler and U. J. Nilsson, *Chimia* **2011**, 65, 18-23; b) S. G. Gouin, J. M. Garcia Fernandez, E. Vanquelef, F.-Y. Dupradeau, E. Salomonsson, H. Leffler, M. Ortega-Munoz, U. J. Nilsson and J. Kovensky, *Chembiochem* **2010**, 11, 1430-1442; c) E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde and W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2663-2664.
- [16] a) P. Soerme, B. Kahl-Knutson, U. Wellmar, U. J. Nilsson and H. Leffler, *Methods Enzymol.* **2003**, 362, 504-512; b) P. Soerme, B. Kahl-Knutsson, M. Huflejt, U. J. Nilsson and H. Leffler, *Anal. Biochem.* **2004**, 334, 36-47.
- [17] a) B. Trastoy, D. A. Bonsor, M. Eugenia Perez-Ojeda, M. Luisa Jimeno, A. Mendez-Ardoy, J. M. Garcia Fernandez, E. J. Sundberg and J. L. Chiara, *Advanced Functional Materials* **2012**, 22, 3191-3201; b) J. Henig, E. Toth, J. Engelmann, S. Gottschalk and H. A. Mayer, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 6124-6138.
- [18] a) P. Wang, Q. Dai, P. Thogaripally, P. Zhang and S. M. Michalek, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 11525-11534; b) E. K. Chea, A. Fernandez-Tejada, P. Damani, M. M. Adams, J. R. Gardner, P. O. Livingston, G. Ragupathi and D. Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 13448-13457; c) M. M. Adams, P. Damani, N. R. Perl, A. Won, F. Hong, P. O. Livingston, G.

- Ragupathi and D. Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1939-1945; d) M. J. Joralemon, K. S. Murthy, E. E. Remsen, M. L. Becker and K. L. Wooley, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 903-913; e) M. J. Lentz and S. W. Kim, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* **1999**, *26th*, 809-810; f) C. M. Yeung, L. L. Klein and P. A. Lartey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 819-822; g) S. L. Bender and R. J. Budhu, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9883-9885; h) K. K. C. Liu and S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4933-4934.
- [19] L. Nurmi, J. Lindqvist, R. Randev, J. Syrett and D. M. Haddleton, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2009**, 2727-2729.
- [20] Y. Feng, J. Li, L. Jiang, Z. Gao, W. Huang, F. Jiang, N. Luo, S. Han, R. Zeng and D. Yang, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 562-568, S562/S561-S562/S529.
- [21] A. Koziara and A. Zwierzak, *Synthesis* **1992**, 1063-1065.
- [22] Galectina-1 C3S se refiere a la mutación Gal1Cys3Ser que provoca un aumento de estabilidad de la galectina sin afectar su afinidad por los ligandos.
- [23] N. Nishi, A. Abe, J. Iwaki, H. Yoshida, A. Itoh, H. Shoji, S. Kamitori, J. Hirabayashi and T. Nakamura, *Glycobiology* **2008**, *18*, 1065-1073.
- [24] C. T. Oeberg, H. Blanchard, H. Leffler and U. J. Nilsson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3691-3694.
- [25] M. Mammen, S.-K. Chio and G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755-2794.
- [26] M. C. Miller, I. V. Nesmelova, D. Platt, A. Klyosov and K. H. Mayo, *Biochem. J.* **2009**, *421*, 211-221.
- [27] M. F. Lopez-Lucendo, D. Solis, S. Andre, J. Hirabayashi, K.-i. Kasai, H. Kaltner, H.-J. Gabius and A. Romero, *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 957-970.
- [28] S. Carlsson, M. C. Carlsson and H. Leffler, *Glycobiology* **2007**, *17*, 906-912.
- [29] I. Cumpstey, E. Salomonsson, A. Sundin, H. Leffler and U. J. Nilsson, *Chembiochem* **2007**, *8*, 1389-1398.
- [30] a) H. Abe, S. Shuto, S. Tamura and A. Matsuda, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6159-6161; b) Y. Okada, T. Mukae, K. Okajima, M. Taira, M. Fujita and H. Yamada, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1573-1576.

## ***Capítulo 6***

*Agregación supramolecular de dendrímeros de POSS en medio acuoso.*

## **6.1 Introducción**

El autoensamblaje es la organización autónoma y espontánea de componentes para formar un sistema estructurado. Es un concepto aplicable a todas las escalas, desde la molecular hasta la planetaria. El estudio y caracterización de estos procesos se está extendiendo a muchas disciplinas, sin embargo, debe acotarse el término a la estructuración de componentes desordenados pre-existentes, de forma reversible y modulable a través del diseño apropiado de sus componentes.<sup>[1]</sup> El acoplamiento de componentes es resultado de la contribución global de factores muy diversos como son la forma, las propiedades superficiales, la carga, la polarizabilidad, el momento dipolar, la masa y la interacción con el disolvente, entre otros, que involucran interacciones no covalentes (fuerzas de Van der Waals, electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de coordinación y contribuciones entrópicas). El control de estos procesos permite modular la síntesis de compuestos nanoestructurados que puedan organizarse de manera convergente y formar sistemas funcionales con estructuras definidas en dimensiones superiores. Además, su estudio resulta de gran interés dada la relevancia que tienen a nivel biológico (plegamiento de proteínas, formación de bicapas lipídicas y monocapas celulares, aglutinación en el sistema inmune...).

Cuando llevamos a cabo los estudios de interacción multivalente de los dendrímeros de carbohidrato basados en POSS mediante anisotropía de fluorescencia (ver Capítulo 4), se observó que el valor de la anisotropía aumentaba con el tiempo, indicando que la rotación de estas moléculas en disolución acuosa se ralentizaba de forma espontánea a lo largo del tiempo. Este hecho sugería la posible formación de agregados de mayor tamaño que deben rotar más lentamente.

Estudios previos han analizado la segregación de los POSS en diferentes matrices así como el empaquetamiento de los cubos en función de los sustituyentes y su estructura. En la mayor parte de los ejemplos descritos, los sustituyentes de los POSS son de naturaleza lipófila. Se ha observado que existe una tendencia general en estos compuestos de geometría cúbica a cristalizar alineando las caras de los cubos de forma paralela en un empaquetamiento hexagonal, que parece sugerir que existe una cierta atracción entre estos cubos en el cristal. En los materiales híbridos, los dominios de POSS así formados constituyen capas inorgánicas que protegen al material incrementando su estabilidad y afectan a la cristalinidad del polímero permitiendo modificar sus propiedades.<sup>[2]</sup> Otros estudios demuestran que este empaquetamiento puede modularse variando la polarizabilidad del entorno del POSS y de sus sustituyentes a través de simples cambios de disolvente que condicionarían la orientación



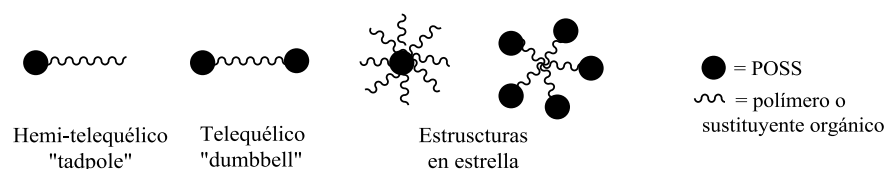
relativa de los cubos.<sup>[3]</sup> En estos estudios se apunta ya la idea de la agregación de los compuestos basados en POSS, sin embargo, al tratarse de POSS con sustituyentes apolares, ninguno de estos ejemplos describían el comportamiento de estas moléculas en medio acuoso.

Con el reciente interés que han despertado estos nanocubos híbridos para aplicaciones biomédicas,<sup>[4]</sup> surgió la necesidad de preparar POSS sustituidos con grupos hidrofílicos para favorecer su solubilidad parcial o total en agua. En este sentido, se han empleado los POSS tanto para evitar la agregación como para provocarla dependiendo de los sustituyentes que contengan, demostrando así que se trata de un núcleo ambivalente y muy versátil que permite el diseño y control de las propiedades supramoleculares. Así, la introducción de un núcleo de POSS rígido permite dirigir la geometría del sistema presentando los sustituyentes orientados de forma tridimensional situando un sustituyente en cada cuadrante del espacio cartesiano, lo que se ha empleado para suprimir la agregación intramolecular de cromóforos<sup>[5]</sup> o bien para favorecer la formación de un determinado tipo de estructuras para dar agregados de tipo *J* de forma selectiva<sup>[6]</sup> o induciendo la formación de estructuras en forma de  $\alpha$ -hélice o de lámina- $\beta$ .<sup>[7]</sup> Además, es importante señalar que la formación de agregados se puede evitar mediante la introducción de cargas formales netas, con lo que se consigue la solubilización completa de los POSS en medios acuosos ya sea mediante unión covalente de un grupo cargado<sup>[5c, 8]</sup> o por coordinación con iones metálicos.<sup>[9]</sup> De esta forma, se obtienen distribuciones homogéneas de las partículas de POSS inferiores a 10 nm en el medio sin agregación.

En los últimos años, con el desarrollo de las técnicas de polimerización controladas (ROP, ATRP, RAFT...), se han preparado polímeros híbridos basados en POSS de estructura bien definida y diseñada para forzar su agregación supramolecular en medios acuosos, bien por introducción de bloques anfifílicos o por incorporación de un grupo hidrófobo que promoviera el autoensamblaje en agua.<sup>[10]</sup> Esta agregación en medios acuosos ha sido utilizada para obtener micelas o vesículas con propiedades muy adecuadas para su aplicación en el transporte y liberación de genes y/o fármacos con internalización transmembrana,<sup>[11]</sup> como surfactantes (“*giant surfactants*”),<sup>[12]</sup> así como nanobloques de construcción con formas preorientadas para la formación de estructuras supramoleculares (“*giant shape amphiphiles*” y “*giant polyhedra*”).<sup>[13]</sup> Se han diseñado además sistemas “inteligentes” capaces de responder a estímulos como variaciones en el pH y en la temperatura de forma que su autoensamblaje se ve afectado dando lugar a morfologías diferentes.<sup>[14]</sup>

El diseño de la estructura primaria de los monómeros condiciona el empaquetamiento por lo que se prediseñan con una forma y geometría concretas (Figura 6.1) que favorezca el

esquema de empaquetamiento requerido.<sup>[10, 13, 15]</sup> Los ejemplos más frecuentes descritos en la bibliografía son los llamados polímeros telequélcos<sup>[16]</sup> (del griego *tele* (lejos) y *chele* (pinza o garra)) en los que uno o más de los extremos de cadena son reactivos, los copolímeros de bloque<sup>[17]</sup> y los polímeros con forma de estrella.<sup>[11c, 14d-f, 18]</sup> Los polímeros telequélcos basados en POSS tienen la unidad de silsesquioxano al final de la cadena polimérica, lo que les proporciona un carácter híbrido además de presentar grupos en los otros vértices del cubo que pueden ser funcionalizados posteriormente. Se recogen así en la bibliografía ejemplos con un extremo funcional (hemi-telequélco, con estructura de cabeza-cola),<sup>[12g, 12l, 14g, 19]</sup> dos extremos (di-telequélco, con estructura de mancuerna)<sup>[20]</sup> o multi-telequélcos.<sup>[21]</sup> En la mayoría de estos ejemplos, los POSS empleados son mono-funcionales y se unen a la cadena polimérica a través del único grupo reactivo. Las 7 posiciones restantes suelen ser restos orgánicos de naturaleza apolar (R = ciclohexilo, metilo, isopropilo, isobutilo...) que suelen formar dominios debido a su hidrofobia proporcionando un carácter anfifílico al polímero hidrosoluble. Por lo general, estos sistemas dan lugar a formaciones cabeza-cola capaces de formar bicapas, vesículas, micelas y estructuras núcleo-corona.



**Figura 6.1** Estructuras más frecuentes basadas en POSS para autoensamblaje.

Además de estas estructuras, se han descrito ejemplos en los que se busca la agregación provocando la formación de enlaces por puentes de hidrógeno intermoleculares<sup>[7, 22]</sup> o bien por interacciones tipo hospedador-huésped.<sup>[18b, 23]</sup> Sin embargo, a pesar del creciente desarrollo de la síntesis de agregados supramoleculares basados en POSS, son muy pocos los ejemplos descritos en los que los sustituyentes del POSS no son de naturaleza polimérica y contienen grupos biológicamente activos.<sup>[11a, 24]</sup> Aunque se ha utilizado la estrategia de agregación de unidades sencillas para la síntesis de compuestos multivalentes de mayor tamaño,<sup>[25]</sup> hasta la fecha solo existe un precedente en el que se emplee el POSS con este fin. Así, el grupo de Kadokawa describió un ejemplo que utiliza el POSS como armazón para este tipo de sistemas que se autoasocian para formar nanopartículas multivalentes.<sup>[24]</sup> En él, se describe la formación de nanopartículas fluorescentes en agua a partir de POSS anfifílicos que contienen sustituyentes de tipo carbohidrato como parte hidrofílica y una unidad de colorante

fluorescente como parte hidrófoba. En dicho trabajo se estudia la agregación en agua de estos sistemas, promovida según los autores por la hidrofobia del grupo cromóforo, pero no se hacen consideraciones acerca del papel que desempeña el núcleo de POSS en este proceso ni tampoco se describen estudios de la actividad biológica de los nanoagregados.

Existe un antecedente teórico que trata de esclarecer el papel de la jaula de POSS en estos fenómenos de agregación.<sup>[26]</sup> Glotzer y colaboradores realizaron cálculos DFT de la estructura de un POSS cúbico tetrasustituido con cadenas poliméricas para encontrar su conformación de mínima energía. Una vez definida la conformación más estable del POSS aislado, calcularon la morfología de sus sistemas autoensamblados considerando las interacciones que se producen entre los POSS cuando se disuelven en un medio “favorable” para sus sustituyentes y “hostil” para el núcleo de silsesquioxano. Los autores describieron las posibles morfologías de autoensamblaje en función de la concentración y de la longitud de los sustituyentes para formar micelas a baja concentración y empaquetamientos hexagonales que dan lugar a formaciones cilíndricas de mayor tamaño como las descritas experimentalmente para el estado sólido o fundido.<sup>[2a, 2e]</sup> Sin embargo, aunque parece clara la formación de micelas por estructuración de las cajas alineando las caras de los cubos en medios polares por su hidrofobia, para minimizar así la superficie de contacto con el medio, son pocos los ejemplos prácticos que lo estudian. Por lo general, el autoensamblaje se ha atribuido al carácter anfifílico de los sustituyentes sin considerar la naturaleza de las interacciones entre los núcleos de POSS.

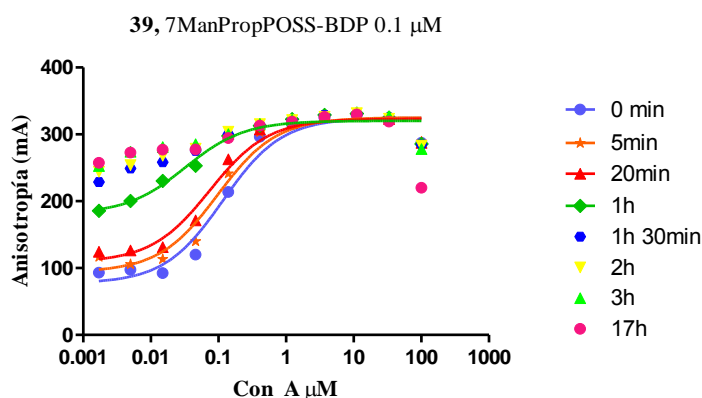
Sobre la base de estos antecedentes y nuestras observaciones en los estudios de anisotropía de fluorescencia, decidimos estudiar la agregación de nuestros sistemas en medio acuoso y su relación con la estructura empleando para ello un conjunto de técnicas para obtener una información lo más amplia y detallada posible sobre el proceso de agregación de nuestros POSS solubles en agua en particular y extrapolable a los POSS en medio acuoso en general: anisotropía de fluorescencia (AF), dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía de transmisión electrónica de barrido (S-TEM), resonancia magnética nuclear (RMN), cromatografía de permeación en gel (GPC), ultracentrifugación analítica (UCA) y estudios fotofísicos del tiempo de vida y rendimiento cuántico de fluorescencia.

## 6.2 Resultados y discusión

Hemos estudiado la agregación en medio acuoso de los compuestos **18** y **39-42**, derivados multivalentes de  $\alpha$ -D-manosa basados en POSS con distinta valencia (de 7 a 21 unidades sacarídicas) y con distinta longitud de espaciador para estudiar la dependencia de la agregación con la estructura.

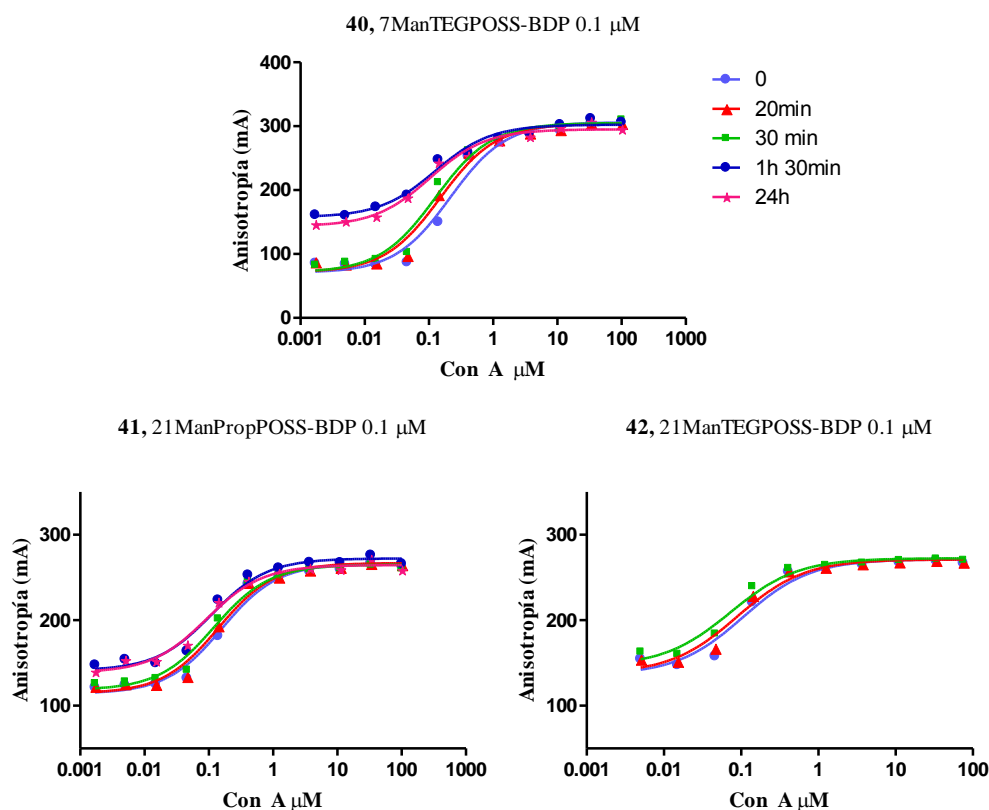
### 6.2.1 Anisotropía de Fluorescencia

En el capítulo 4, se describieron las bases físicas de la técnica de anisotropía de fluorescencia (AF). Cuando llevamos a cabo los estudios de interacción de los glicodendrimeros de POSS con lectinas mediante AF, realizamos además un seguimiento de la evolución de la reacción de complejación a lo largo del tiempo. Estas medidas se llevaron a cabo a pH fisiológico (7.4) en una disolución tampón 10 mM de HEPES con NaCl 150 mM, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  y 1 mM  $\text{MnCl}_2$ . Al igual que en el capítulo 4, se realizó una valoración con una cantidad creciente de Con A para una concentración fija (0.1  $\mu\text{M}$ ) del ligando glico-POSS correspondiente. Se midió el valor de la anisotropía para cada concentración a distintos tiempos de incubación a temperatura ambiente. De forma sorprendente, observamos un aumento claro de los valores de anisotropía del glico-POSS **39** a lo largo del tiempo cuando no había todavía proteína (Con A) en el medio (valores  $A_0$ ) (Figura 6.2).



**Figura 6.2** Evolución de AF en función del tiempo de **39** en HEPES, a pH 7.4 y temperatura ambiente. Las curvas de ajuste correspondientes a tiempos superiores a 1 h. no han sido representadas ya que su ajuste al modelo 1:1 no converge. El punto a mayor concentración de proteína no fue considerado en el ajuste ya que el alto grado de entrecruzamiento de la lectina tetramérica a alta concentración provoca turbidez en el pocillo.

Estudiamos también esta misma evolución para el resto de ligandos **40-42**. Los resultados muestran la misma tendencia de aumento del valor de  $A_0$  con el tiempo de incubación en todos los casos (Figura 6.3). El efecto es mucho menos pronunciado en el caso de los dendrímeros con 21 unidades de  $\alpha$ -D-manosa (**41** y **42**) que en los glico-POSS más pequeños con 7 unidades de  $\alpha$ -D-manosa (**39** y **40**).

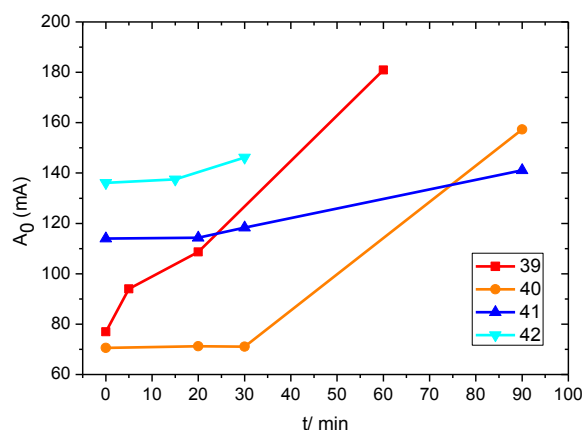


**Figura 6.3** Curvas de AF de los compuestos **40-42** en tampón HEPES a pH 7.4 y temperatura ambiente. en función del tiempo y de la concentración de Con A.

Probablemente esto es debido al efecto “*propeller*”,<sup>[27]</sup> como se ha explicado ya en elos Capítulo 4, de forma que los valores de anisotropía alcanzados no dependen sólo de la rotación del complejo ligando-proteína formado sino también de la rotación del cromóforo por sí sólo. En los dendrímeros de mayor tamaño, el BODIPY queda más lejos del sitio de unión de la lectina y, por tanto, su rotación está menos restringida. Esta menor restricción del giro del BODIPY es también aplicable a los dendrímeros en ausencia de lectina en el medio, ya que al tener éstos espaciadores más largos que los compuestos con sólo 7 carbohidratos, presentan una menor congestión estérica y, por tanto, mayor posibilidad de

giro, de forma que los valores de  $A_0$  obtenidos para estos sistemas son inferiores a los esperados.

Un incremento en la anisotropía es la consecuencia esperable de una disminución de la velocidad de rotación. Este hecho sugiere que se están produciendo formaciones moleculares de mayor tamaño (agregados) que rotarían más despacio. En la Figura 6.4 se representa el aumento del valor de  $A_0$  para cada compuesto a lo largo del tiempo.

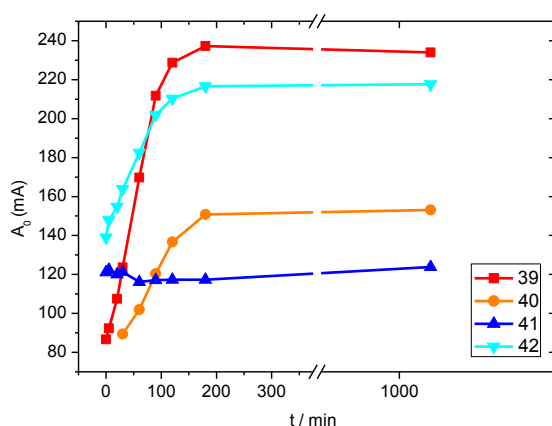


**Figura 6.4** Evolución del valor de  $A_0$  para los compuestos 39-42 en tampón HEPES a pH 7.4 y temperatura ambiente en función del tiempo.

Por el contrario, es importante señalar además que para los puntos de la valoración en los que la concentración de Con A es ya lo suficientemente alta como para complejar todo el ligando presente, no se observan cambios en el valor de anisotropía a lo largo del tiempo. Es decir, el proceso agregación parece no interferir en la formación del complejo final con la lectina y se siguen formando estructuras entrecruzadas ligando-proteína de dimensiones similares independientemente del tiempo. Dado que se llega siempre al mismo valor de  $A_{\max}$ , con independencia del tiempo de preincubación, podemos concluir que la lectina es capaz de disgregar eficazmente los agregados para generar así la red de entrecruzamiento lectina/glico-POSS con el ligando en su estado monomérico, como han observado otros autores recientemente para la interacción entre Con A y otros glicoclusteres que también sufren un proceso de autoensamblaje hidrófobo en medio acuoso.<sup>[28]</sup> En cuanto a los parámetros termodinámicos y cinéticos que hemos determinado en esta tesis y en trabajos anteriores para la interacción de los glico-POSS con las lectinas, podemos razonablemente concluir que no están afectados por este efecto de agregación del

ligando, ya que la constante de equilibrio de agregación es muy inferior a la de complejación con la lectina.<sup>[29]</sup> Dado el aumento del valor de  $A_0$  como consecuencia de la agregación del ligando, solo los valores de  $K_D$  calculados para las curvas a  $t = 0$  (sin preincubación: ligando monomérico) estarían libres de este efecto de agregación.

Para descartar los posibles procesos de hidrólisis y condensación del armazón inorgánico del POSS que dan lugar a estructuras poliméricas de mayor tamaño, descritos anteriormente para estos sistemas,<sup>[30]</sup> como responsables del incremento de tamaño para los tiempos estudiados, se repitieron las medidas de anisotropía a pH ácido para evitar así la hidrólisis del armazón de POSS. Tanto a pH 6.5, empleando una disolución salina tamponada de HEPES 10 mM, como a pH 5.25, en tampón de acetato sódico 50 mM (Figura 6.5), se apreciaron las mismas tendencias de incremento de anisotropía a lo largo del tiempo. Se puede concluir, por tanto, que los cambios de anisotropía y, por ello, los fenómenos de aumento de tamaño observados no derivan de polimerizaciones (uniones covalentes) de la estructura inorgánica del silsesquioxano sino que están necesariamente relacionados con procesos de agregación no covalente de nuestros POSS en disolución acuosa.



**Figura 6.5** Evolución del valor de  $A_0$  para los compuestos **39-42** (0.1  $\mu\text{M}$ ) en función del tiempo a pH 5.25 tampón acetato sódico y a temperatura ambiente.

Nuestros datos experimentales muestran que, a tiempo cero e independientemente del pH, cada compuesto tiene un valor de anisotropía  $A_0$  que correlaciona bien con su tamaño monomérico. Así, los compuestos con 7 unidades de  $\alpha$ -D-manosa (**39** y **40**) tienen un valor inicial similar que es inferior al de los dendrímeros con 21 unidades (**41** y **42**), que

rotan más despacio por su mayor tamaño, observándose la siguiente tendencia para los valores de  $A_0$ : **39** < **40** < **41** < **42**. La evolución de  $A_0$  a lo largo del tiempo debe variar según la tendencia de cada compuesto a formar agregados, la velocidad de agregación y el número de agregación ( $N_{ag}$ , unidades que se incorporan en la formación del agregado).

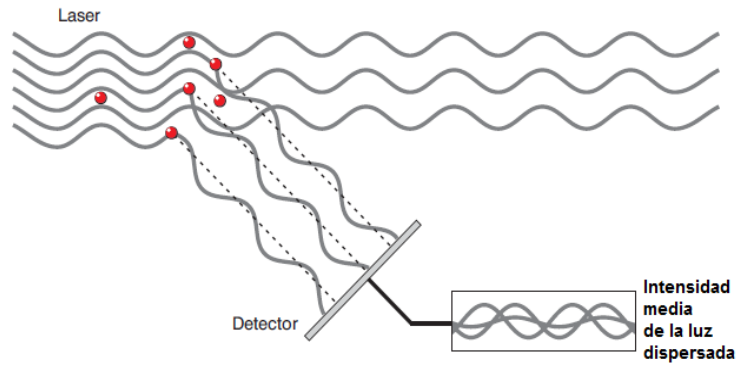
A pH ácido, donde se descartan posibles interferencias de otros procesos, se observa una agregación rápida que alcanza el equilibrio en aproximadamente 3 horas para todos los compuestos, formándose agregados de tamaño estable ( $A_0$  constante para  $t > 3$  h). Este hecho sugiere además la idea de que el agregado formado parece presentar una estructura ordenada con un número limitado de moléculas de glico-POSS integradas en el agregado final en equilibrio dinámico. La agregación es más rápida para el compuesto más pequeño (**39**) (Figura 6.5, rojo) y, dado que alcanza valores de  $A_0$  muy altos, probablemente se llegue a un  $N_{ag}$  también elevado. Este compuesto es el que presenta el porcentaje relativo de POSS mayor y por tanto un mayor balance hidrófobo/hidrófilo.<sup>[18a, 26]</sup> La tendencia observada indica que los factores determinantes de la agregación son la hidrofobia total del sistema (**39**, **40** > **41**, **42**; **39** > **40**, por lo que **39** y **40** son los sistemas más agregados) y la congestión estérica alrededor del núcleo de silsesquioxano (**41** > **42**, por lo que el compuesto **42** se agrega más que **41**). El balance entre ambos factores, hidrofobia (determinada principalmente por la proporción relativa del núcleo de POSS con respecto al resto de la molécula) y congestión estérica, determina el autoensamblaje de los glico-POSS en medio acuoso.

El valor final de  $A_0$  alcanzado en el equilibrio puede dar idea del valor relativo de  $N_{ag}$  de los distintos compuestos aunque, debido a la distinta movilidad que poseen los derivados con 7 y 21 unidades de carbohidrato, es necesario completar el estudio empleando otras técnicas para poder estimar mejor ese parámetro.

### 6.2.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz o DLS, por sus siglas en inglés de "*Dynamic light Scattering*", también llamada espectroscopia de correlación de fotones, es una técnica físico-química empleada para medir el movimiento Browniano y su relación con la distribución de tamaños de partículas en suspensión, o de macromoléculas en disolución. Para ello, un haz láser ilumina la muestra y se analiza la intensidad de las fluctuaciones de la luz dispersada (Figura 6.6).



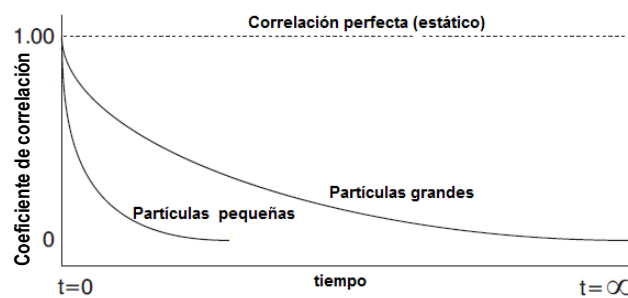


**Figura 6.6** Luz dispersada que llega al detector de DLS<sup>[31]</sup>

Una característica del movimiento Browniano es que la velocidad a la que se mueven las partículas en un fluido depende de su tamaño. Esta dependencia está descrita por la relación de Stokes-Einstein, que determina la constante de difusión de una partícula según la siguiente ecuación:

$$D = k_b T / 6\pi\eta R_h \quad (\text{Ec 6.1})$$

donde  $D$ , es la constante de difusión,  $k_b$ , la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta del fluido,  $\eta$  la viscosidad del fluido y  $R_h$  el radio hidrodinámico de la partícula. Como las partículas están en movimiento, las ondas constructivas y destructivas de la luz dispersada, que provocan zonas iluminadas u oscuras en el detector, fluctúan en intensidad. De la fluctuación de estas señales en periodos cortos de tiempo (de nano o micro segundos) se puede obtener una función de correlación que tiende a cero a tiempos largos ya que la partícula se mueve al azar. Como las partículas de mayor tamaño se mueven más lentamente, su correlación decae más lentamente a lo largo del tiempo (Figura 6.7). El tamaño de la partícula se puede calcular a través de un algoritmo matemático aplicado a esta función de decaimiento.



**Figura 6.7** Función de correlación en función del tamaño.<sup>[32]</sup>

Hay que tener en cuenta que las partículas de mayor tamaño contribuirán más a esta distribución ya que dispersan más luz que las partículas pequeñas, siendo la dispersión proporcional a la sexta potencia de su diámetro (según la aproximación de Rayleigh, Ecuación 6.2).

$$I = I_0 \cdot \frac{(1+\cos^2\theta)}{2R^2} \cdot \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \cdot \left(\frac{n^2-1}{n^2+2}\right)^2 \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^6 \quad (\text{Ec 6.2})$$

Sobre la base de los resultados obtenidos en los estudios de AF, decidimos ampliar el estudio de la agregación empleando DLS con el fin de:

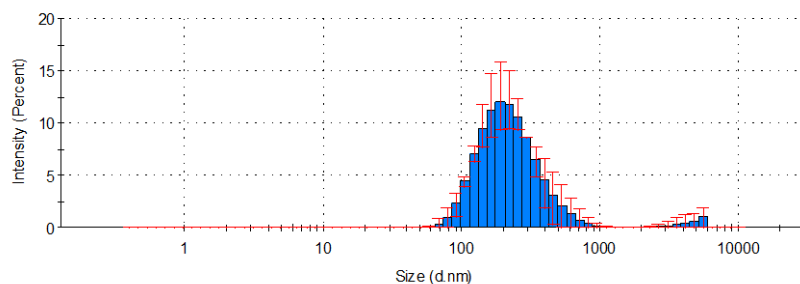
- A) Confirmar el proceso de agregación deducido de las medidas de AF.
- B) Estudiar la influencia del BODIPY sobre el proceso de agregación.
- C) Estudiar la influencia del disolvente empleado.
- D) Descartar posibles interacciones carbohidrato-carbohidrato como responsables de la agregación.
- E) Estudiar la influencia de la naturaleza química del conector así como de la multivalencia. Descartar al 1,2,3-triazol como posible responsable de la agregación.

Se evaluaron para ello los glicodendrímeros de POSS a diferentes concentraciones (0,1, 1, 5, 25 y 100  $\mu\text{M}$  en agua MilliQ) utilizando dispersión dinámica de luz (DLS). A continuación se mostrarán sólo los resultados para las concentraciones más altas ya que las más diluidas no dieron una buena función de correlación para las medidas de DLS y los datos no cumplían los criterios de calidad mínimos requeridos por la técnica. Las distribuciones de tamaños en intensidad se expresan en términos del diámetro hidrodinámico. Los resultados se han obtenido del promedio de 3 medidas independientes empleando un ángulo de  $173^\circ$  entre el sistema de irradiación y el de detección. Los compuestos marcados fluorescentemente pudieron ser estudiados sin problemas mediante esta técnica, ya que no absorbían a longitud de onda láser del instrumento (633 nm). Los experimentos se llevaron a cabo a  $25^\circ\text{C}$  y a distintos tiempos de incubación para seguir la evolución temporal del proceso de agregación.

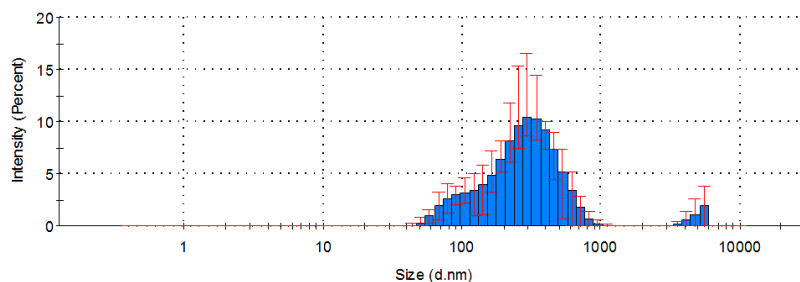
#### *A. Confirmación del proceso de agregación observado previamente por AF*

Para este estudio, se eligieron los glico-POSS de menor y mayor tamaño, **39** (7ManPropPOSS-BDP) y **42** (21ManTEGPOSS-BDP), respectivamente, para observar así

los límites del comportamiento de agregación y cubrir todo el rango de tamaños sintetizados. Las distribuciones de tamaños que se obtuvieron para ambos compuestos difieren en más de un orden de magnitud de los diámetros moleculares calculados teóricamente<sup>[33]</sup> para los compuestos con los sustituyentes en su conformación más extendida posible (ver Capítulo 4). Así, para los compuestos **39** y **42** se calcularon unos diámetros teóricos de 4.0 nm y 10.4 nm, respectivamente, mientras que las medidas de DLS muestran distribuciones de tamaños centradas en 190 nm (Figura 6.8) para el compuesto **39** y en 295 nm para **42** (Figura 6.9). Se confirmó así la formación de agregados de cientos de nanómetros para ambos compuestos. En ambos casos, las distribuciones observadas muestran también la formación de agregados de varias micras. Sin embargo, teniendo en cuenta que las partículas de gran tamaño contribuyen mucho a las distribuciones por intensidad, probablemente la formación de agregados con un tamaño de micras es prácticamente despreciable y, en buena aproximación, podemos considerar exclusivamente el pico mayoritario de la distribución.



**Figura 6.8** Distribución de tamaños por intensidad para **39** (7ManPropPOSS-BDP) medida por DLS a concentración 100  $\mu$ M en H<sub>2</sub>O.

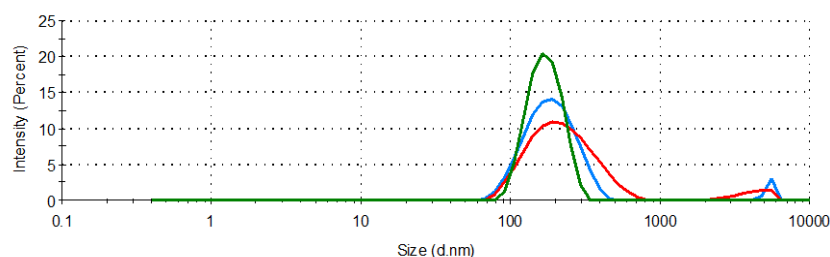


**Figura 6.9** Distribución de tamaños por intensidad para **42** (21ManTEGPOSS-BDP) medida por DLS a concentración 100  $\mu$ M en H<sub>2</sub>O.

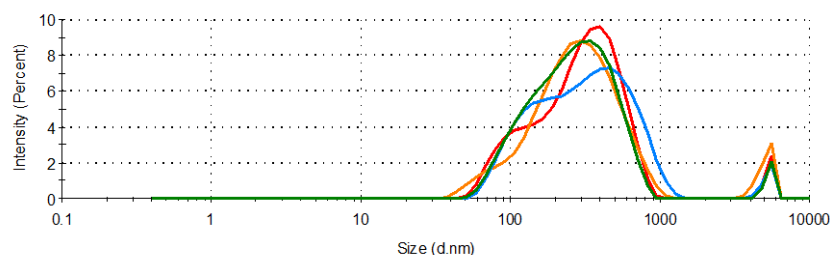
Al comparar ambas distribuciones, se observa que el compuesto **39**, con 7 unidades de manosa y un espaciador corto, parece formar agregados más uniformes que el

compuesto **42**. Probablemente, el proceso de agregación para este último sea más costoso dado la mayor congestión estérica alrededor del núcleo de POSS y la mayor flexibilidad y longitud de sus cadenas espaciadoras, como refleja su distribución más heterogénea y el hombro que en ésta se aprecia (Figura 6.9).

Se realizó además un estudio de la agregación de ambos compuestos en función del tiempo. Las Figuras 6.10 y 6.11 muestran la evolución de la curva de la distribución de tamaños para cada tiempo estudiado.<sup>[34]</sup>



**Figura 6.10** Evolución de la distribución de tamaños en intensidad en función del tiempo medida por DLS para el compuesto **39** (7ManPropPOSS-BDP). Rojo: t = 0 h.; azul: t = 2 h.; verde: t = 24 h.

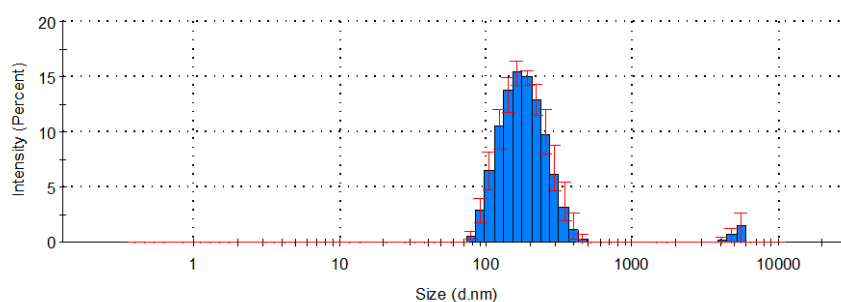


**Figura 6.11** Evolución de la distribución de tamaños en intensidad en función del tiempo medida por DLS para el compuesto **42** (21ManTEGPOSS-BDP). Rojo: t = 0 h.; naranja: t = 1 h.; azul: t = 2 h.; verde: t = 24 h.

Los cambios a lo largo del tiempo no son muy significativos en cuanto al tamaño promedio de las partículas, aunque sí que se aprecia una tendencia a la homogeneización de tamaños de los agregados. Esto se refleja en el estrechamiento moderado de la curva correspondiente a la distribución de tamaños del compuesto **39** (Figura 6.10) y en la evolución observada del carácter heterogéneo de la distribución de **42** (Figura 6.11), cuyo hombro tiende a desaparecer a lo largo el tiempo, aunque mantenga una alta polidispersidad (anchura de la distribución).

*B. Estudio de la influencia del BODIPY en el proceso de agregación*

A pesar de que se ha descrito que los colorantes de la familia de los BODIPYs no tienen tendencia a formar agregados,<sup>[35]</sup> hay pocos estudios orientados a estudiar estos fenómenos en medio acuoso dada la baja solubilidad de los BODIPYs en este medio. Decidimos comprobar si la autoasociación de los glico-POSS ocurría por agregación del cromóforo en vez de por la propia hidrofobia del núcleo de POSS. Para ello, se estudiaron comparativamente el compuesto de menor tamaño marcado con el colorante fluorescente BODIPY **39** (7ManPropPOSS-BDP) (Figura 6.8) y su equivalente sin colorante **18** (8ManPropPOSS) (Figura 6.12), para comprobar si existe alguna diferencia sustancial en la distribución de tamaños obtenida o en su evolución temporal.



**Figura 6.12** Distribución de tamaños por intensidad de **18** (8ManPropPOSS) medida por DLS a concentración 100  $\mu$ M en H<sub>2</sub>O.

No se apreciaron cambios significativos al comparar el compuesto fluorescente **39** con su equivalente sin colorante **18** ya que para ambos se registraron distribuciones monomodales centradas en 190 y 164 nm respectivamente. La distribución obtenida para **18** fue algo más estrecha, probablemente debido a la mayor simetría del compuesto que permite formar estructuras más ordenadas y homogéneas. Al estudiar la evolución de la curva con el tiempo (2 y 24 horas) no se observó ningún cambio en la distribución de tamaños. Por tanto, de estos resultados se puede concluir que, aunque la presencia del colorante afecta levemente al tamaño molecular y al tamaño del agregado final, no parece jugar un papel significativo en el proceso global de agregación, contrariamente a lo descrito previamente por otros autores para derivados POSS similares.<sup>[24]</sup>

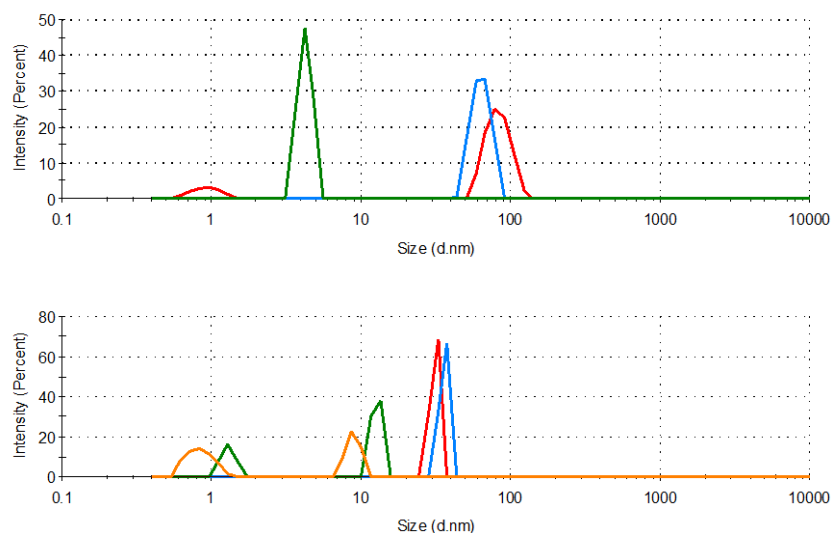
*C. Estudio de la influencia del disolvente en la agregación*

Se llevaron a cabo las medidas de DLS en distintos disolventes para estudiar si la agregación está gobernada por interacciones hidrofóbicas. Se seleccionaron nuevamente para este estudio los compuestos de menor y mayor tamaño (**39** y **42** respectivamente) y se analizó su comportamiento en los siguientes disolventes: H<sub>2</sub>O, D<sub>2</sub>O, etilenglicol y MeOH.

A nivel macroscópico, numerosos estudios tanto experimentales<sup>[36]</sup> como teóricos<sup>[37]</sup> han demostrado que en el agua los enlaces de deuterio son más fuertes que los enlaces de hidrógeno en ~ 0,1 a 0,2 kcal/mol. Aunque este aumento de la fuerza de enlace es pequeño para los enlaces individuales, el efecto acumulativo para una molécula grande en disolución puede ser elevado. En nuestro caso, no se observaron cambios relevantes entre las medidas realizadas en H<sub>2</sub>O y D<sub>2</sub>O por lo que descartamos que el proceso de agregación estuviera gobernado significativamente por la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los glico-POSS.

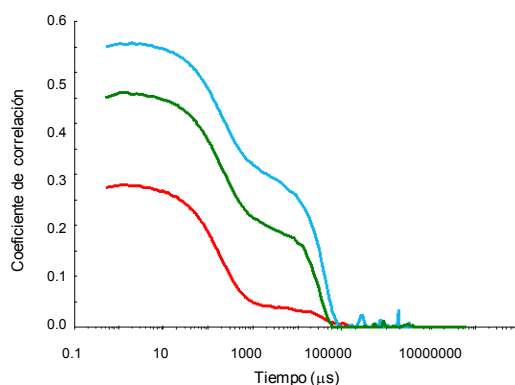
Los resultados en etilenglicol no fueron concluyentes porque las funciones de correlación obtenidas en las diversas medidas no eran fiables y las distribuciones de tamaño calculadas eran muy variables. Además, las disoluciones tenían una textura iridiscente observable a simple vista que debía de estar afectando directamente al índice de refracción de la muestra y, por tanto, a la medida de la dispersión.

Los resultados en MeOH apoyan la hipótesis de que la hidrofobia del núcleo de POSS es la causa principal de la agregación. Así, al medir el compuesto **39** (en concentración 100 µM) en MeOH no se observó ningún pico de distribución de tamaños. Las partículas, por tanto, están homogéneamente dispersas y no agregadas; el diámetro calculado de 4 nm para el conformero totalmente extendido de este glico-POSS es muy próximo al límite de detección y, por tanto, la luz no se dispersa suficientemente como para que el equipo la pueda detectar. Al adicionar un pequeño porcentaje de H<sub>2</sub>O (1 ó 5 %) se observó el comienzo del proceso de formación de agregados. En ambos casos, parece que la adición de agua provoca la formación de agregados debido a la alta concentración local de agua en la zona de la disolución donde se adiciona el H<sub>2</sub>O. Transcurridos unos segundos, el proceso se detiene al diluirse el agua en el medio ya que la cantidad añadida es demasiado baja y la solvatación con las moléculas de metanol predomina. En la Figura 6.13 se observa el decrecimiento del tamaño de partícula a medida que el agua añadida se diluye en el metanol y éste deshace los agregados inicialmente formados.



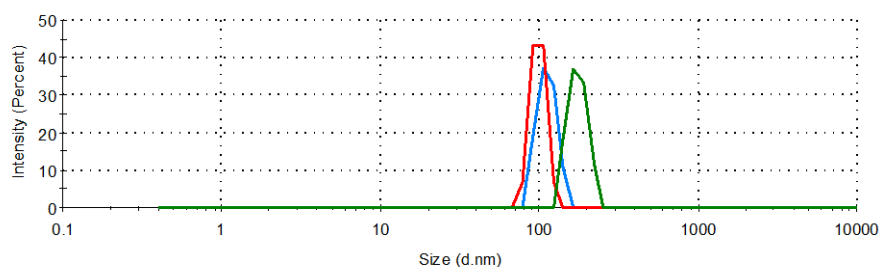
**Figura 6.13** Distribución de tamaños en intensidad del compuesto **39** (7ManPropPOSS-BDP) medida por DLS para una disolución 100  $\mu\text{M}$  en MeOH con un porcentaje de  $\text{H}_2\text{O}$  añadido del 1% (arriba) y del 5 % (abajo). Medidas sucesivas: rojo (1), azul (2), verde (3) y naranja (4).

Al incrementar el porcentaje de agua añadida hasta un 10 % (la concentración final de glico-POSS en este caso era 80  $\mu\text{M}$ ), se observó que cuanto mayor era el porcentaje de agua en el medio, mayor era el tamaño de los agregados. La distribución de tamaños encontrada para esta proporción era ya muy próxima a la encontrada para los agregados en medio acuoso (Figura 6.8) aunque su correlograma muestra todavía la coexistencia de dos especies distintas en la disolución (Figura 6.14).



**Figura 6.14** Curvas de correlación de la intensidad de luz dispersada en función del tiempo para el compuesto **39** 80  $\mu\text{M}$  en MeOH con un 10% de  $\text{H}_2\text{O}$ . Medidas sucesivas: rojo (1), azul (2) y verde (3).

Realizamos el mismo estudio para el compuesto **42** (21ManTEGPOSS-BDP) midiendo las distribuciones de tamaño en MeOH y en mezclas MeOH/H<sub>2</sub>O en distintas proporciones. La distribución de tamaños registrada para el compuesto **42** en una disolución 100  $\mu$ M en MeOH (Figura 6.15) mostró agregados de menor tamaño que los registrados en agua, pero sí que parece que hay agregación, en contra de lo que cabría esperar a la vista de los resultados obtenidos para el compuesto **39**, aunque con una distribución de tamaños mucho más estrecha que en agua.



**Figura 6.15** Distribución de tamaños en intensidad del compuesto **42** (21ManTEGPOSS-BDP) medida por DLS 100  $\mu$ M en MeOH. Medidas sucesivas: rojo (1), azul (2) y verde (3).

El hecho de que el dendrímero de mayor tamaño y valencia sí forme agregados en medios menos polares que el agua, como el metanol, podría justificarse de dos formas:

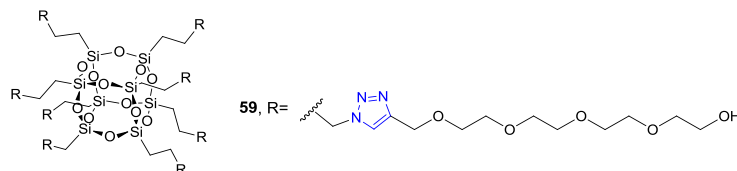
- Una mayor tendencia de **42** a la formación de agregados. Sin embargo, se descartó esta justificación ya que este compuesto tiene un menor porcentaje de POSS y por tanto un carácter hidrófobo menor que el compuesto **39**.

- Presencia de agua ocluida entre las cadenas laterales de tetraetilenglicol dada su elevada higroscopia.<sup>[38]</sup> Es posible que el agua residual retenida por el compuesto sea capaz de promover la agregación por sí sola, ya que como se vio anteriormente la adición de tan sólo un 1 % de agua ya la promovía. Sin embargo, las curvas de correlación y los ajustes no cumplen los criterios mínimos de calidad, probablemente debido al dinamismo de la agregación cuando hay una baja proporción de agua en el medio. Añadiendo un 10% de agua (con una concentración final de **42** de 90  $\mu$ M) se observó que la distribución se desplaza hacia tamaños mayores, próximos a los que se registraron en agua pura, y se hace más estable en el tiempo.



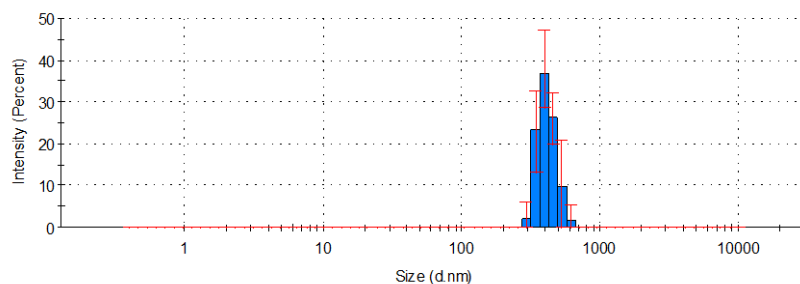
*D. Estudio de las interacciones carbohidrato-carbohidrato como posibles responsables de la agregación*

Se midió para este fin el diámetro hidrodinámico de un POSS octafuncionalizado con cadenas de tetraetilenglicol **59** (8TEGPOSS)<sup>[30a]</sup> (Figura 6.16), sintetizado previamente en nuestro grupo de investigación, y del compuesto **54** (7GalPropPOSS-BDP), análogo al **39** pero con unidades de  $\beta$ -D-galactosa en lugar de  $\alpha$ -D-manosa.



**Figura 6.16** Estructura del POSS modelo **59**.

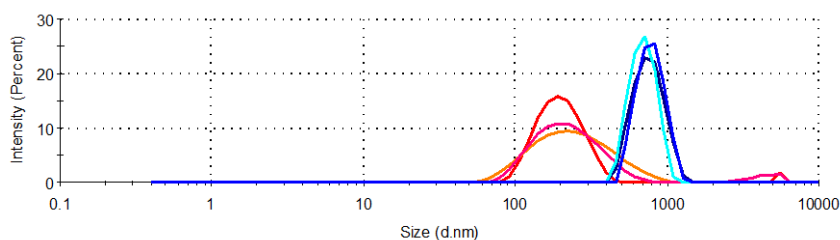
La distribución de tamaños encontrada para **59** (8TEGPOSS) estaba centrada en 396 nm (Figura 6.17), tamaño muy superior a su diámetro molecular teórico (5.3 nm en su conformación más extendida, según los cálculos semiempíricos AM1 con optimización completa de geometría), demostrando así que un compuesto análogo que carece de las unidades terminales de carbohidrato agregaba en la misma extensión y que el carbohidrato, por tanto, no era responsable de la agregación, actuando solo como corona hidrófila de la molécula al igual que las cadenas de tetraetilenglicol de **59**.



**Figura 6.17** Distribución de tamaños por intensidad de **59** (8TEGPOSS) medida por DLS a concentración 100  $\mu$ M en H<sub>2</sub>O.

De la misma forma, para el compuesto con  $\beta$ -galactosa **54** (7GalPropPOSS-BDP) se obtuvo una distribución de tamaños centrada en 712 nm corroborando que la agregación es promovida por el núcleo de POSS y no por el carbohidrato, aunque la estereoquímica del carbohidrato sí parece influir en el tamaño final del agregado formado. Un efecto similar se observa en la formación de micelas a partir de glicolípidos simples, cuya configuración

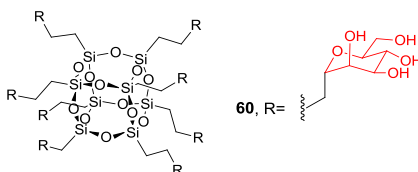
anomérica influye directamente en el tipo de empaquetamiento al que dan lugar.<sup>[39]</sup> La Figura 6.18 muestra la diferencia en la distribución de tamaños encontrada para los derivados equivalentes de  $\alpha$ -D-manosa **39** y  $\beta$ -D-galactosa **54**.



**Figura 6.18** Distribuciones de tamaño en intensidad de los compuesto **39** (rojos) y **54** (azules) medida por DLS (3 medidas independientes para cada compuesto) para disoluciones 100  $\mu$ M en agua.

#### *E. Influencia del grupo 1,2,3-triazol del conector en la agregación*

Para este estudio se empleó el glico-POSS **60** (Figura 6.19) preparado previamente en nuestro grupo de investigación mediante una reacción de metátesis cruzada de olefinas entre el octavinil-POSS **2** y un C-glicósido análogo de  $\alpha$ -D-manopiranososa con un grupo alqueno terminal, seguida de hidrogenación (Dra. B. Trastoy, resultados sin publicar). En el glico-POSS **60**, las unidades de  $\alpha$ -D-manosa están directamente unidas al POSS a través de una cadena alifática de 3 carbonos.



**Figura 6.19** Estructura del C-glicósido **60** estudiado.

La distribución de tamaños observada por DLS para una disolución 100  $\mu$ M en agua de este compuesto demuestra que se forman agregados con un tamaño promedio de unos 190 nm. Esta distribución es prácticamente igual a la encontrada para el derivado **18**, preparado vía “click” (ver Figura 6.12), lo que sugiere que los anillos de 1,2,3-triazol no influyen de forma apreciable en el proceso de autoensamblaje de los glico-POSS en agua.

### 6.2.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El microscopio de fuerza atómica (AFM, de sus siglas en inglés Atomic Force Microscope) es un instrumento mecano-óptico capaz escanear la topografía de una superficie mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica (Figura 6.20). La fuerza de interacción entre esta punta y las moléculas de la superficie (del orden de nanonewtons) desvían la palanca de gran flexibilidad sobre la que se soporta la punta. Este movimiento se mide mediante la desviación de un haz de luz láser que permite detectar cambios topológicos de dimensiones nanométricas en la superficie.<sup>[40]</sup>

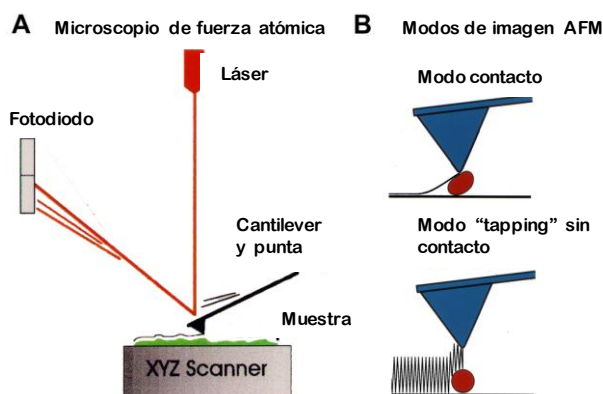
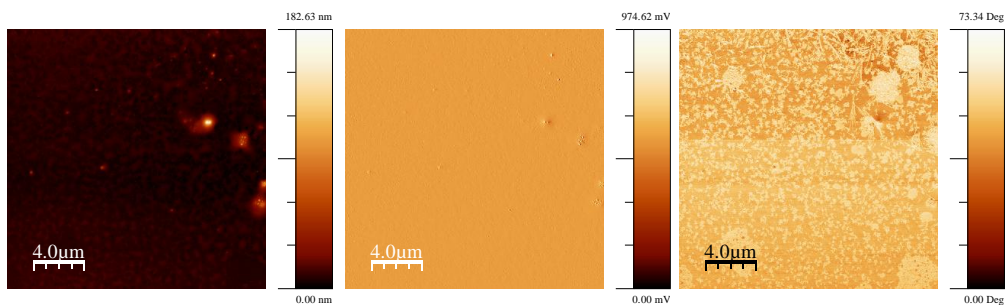


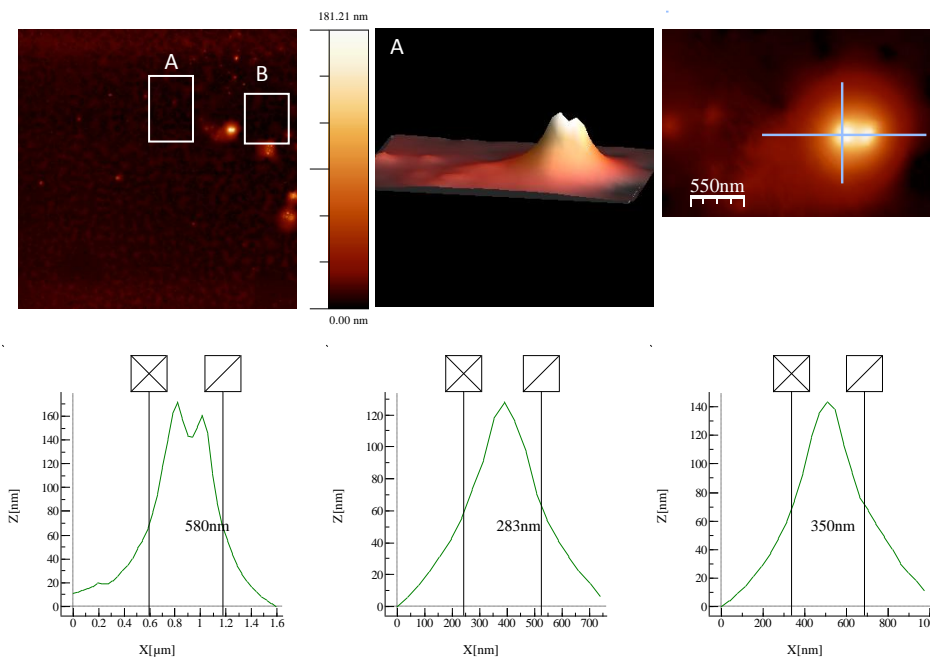
Figura 6.20 Esquema del funcionamiento del AFM.<sup>[41]</sup>

Para nuestro estudio, se seleccionaron nuevamente los compuestos **39** y **42** por ser estos glico-POSS los de menor y mayor tamaño molecular, respectivamente. Se optimizó la concentración de las muestras a 5  $\mu\text{M}$ , que se depositaron y evaporaron sobre un soporte de vidrio. Se observó una distribución de tamaño de los agregados de 100-300 nm que está de acuerdo con las medidas de DLS descritas en el apartado anterior (Figuras 6.8 y 6.9). Se observan asimismo formaciones debidas al colapso de varios agregados que alcanzan tamaños de hasta 500-800 nm para ambos compuestos (Figuras 6.22 y 6.25). La morfología observada es en general aproximadamente esférica, siendo los agregados algo más pequeños en promedio para el compuesto **39** (7ManPropPOSS-BDP) que para el **42** (21ManTEGPOSS-BDP).

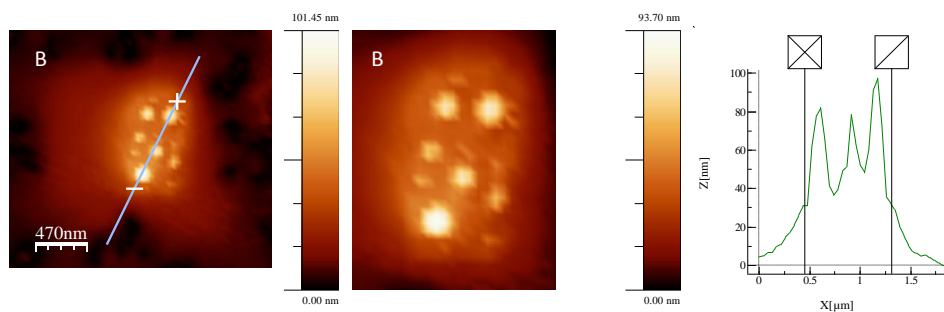
Para el compuesto **39** (Figura 6.21) se observan tamaños de agregados individuales de 100-200 nm y aglomeraciones de los mismos que forman estructuras de mayor tamaño (Figuras 6.22 y 6.23).



**Figura 6.21** Imagen AFM de **39**, 5  $\mu\text{M}$  en  $\text{H}_2\text{O}$ . (Z en nm, amplitud en V y fase en grados).

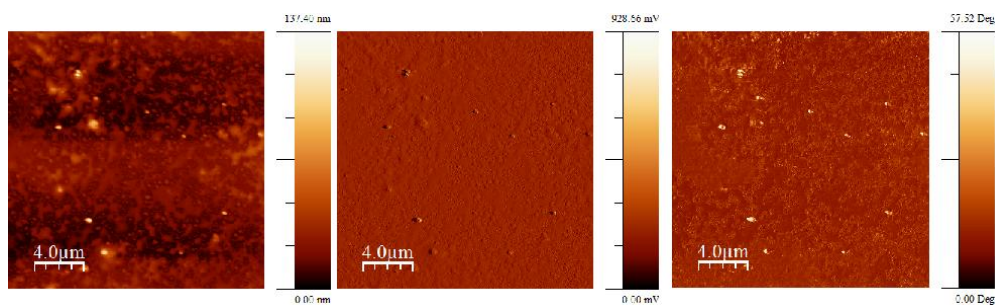


**Figura 6.22** Arriba: Imagen 3D de **39** y ampliación del área A. Abajo: Perfil de la ampliación en las direcciones señaladas.

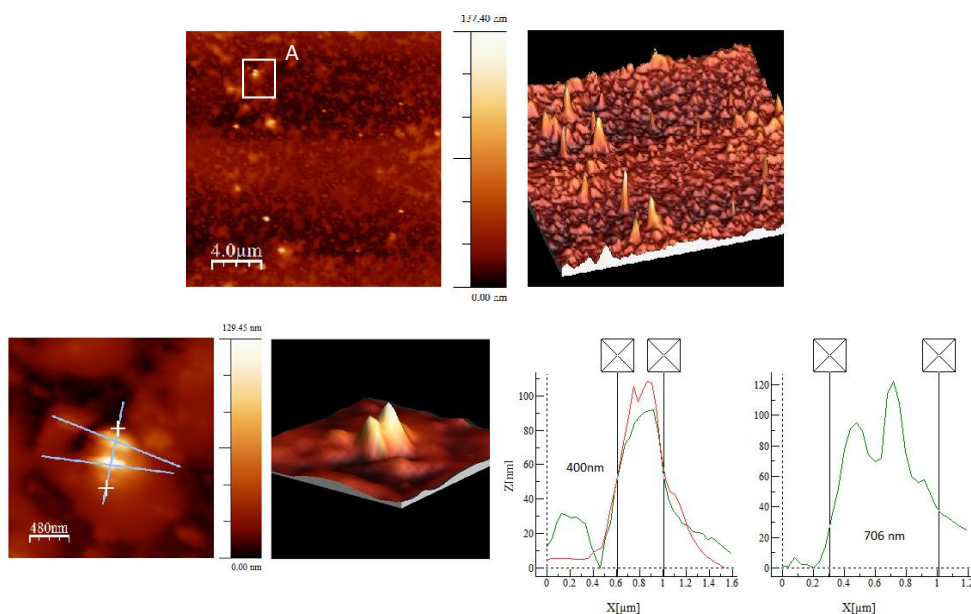


**Figura 6.23** Imagen 3D ampliada de la zona B señalada en la figura anterior y perfil del colapso de agregados.

El compuesto **42** da lugar a formaciones de tamaño ligeramente superior (200-300 nm) y, al igual que el compuesto anterior, la acumulación de varios agregados forma estructuras de tamaño cercano a la micra (Figuras 6.24 y 6.25).



**Figura 6.24** Imagen AFM de **42**, 5 µM en H<sub>2</sub>O. (Z en nm, amplitud en V y fase en grados).



**Figura 6.25** Arriba: Imagen 3D de **42** (Z en nm). Abajo: Ampliación y perfiles de la zona A señalada.

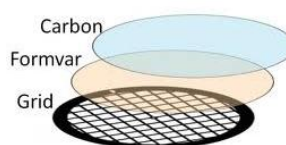
La superficie convexa de los perfiles (secciones) medidos (Figuras 6.22 y 6.25) sugieren que no hay agua ocluida en el interior de la partícula;<sup>[42]</sup> descartando así la formación de estructuras de tipo liposoma y apuntando hacia la formación más bien de micelas con la zona hidrófoba en el interior y los carbohidratos orientados hacia el exterior en contacto con el medio acuoso. Aunque cabría pensar que el colapso de varios agregados podría deberse al proceso de secado, los tamaños alcanzados correlacionan bien con los

encontrados por DLS en disolución acuosa. Probablemente existe una tendencia de los agregados a continuar formando estructuras de orden superior y mayor tamaño.

#### 6.2.4 Microscopía electrónica de barrido en modo transmisión (STEM)

El Microscopio electrónico de barrido o SEM (del inglés: “Scanning Electron Microscopy”), utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. Es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de sólidos. Con los microscopios electrónicos se pueden obtener electrones acelerados con  $\lambda$  asociada bastante menor de 1 Å y, por tanto, se pueden registrar imágenes, al menos teóricamente, con resolución atómica. Con las lentes adecuadas se pueden transformar los electrones difractados en la imagen real. Una técnica relacionada consiste en detectar los electrones transmitidos a través de la muestra mientras se escanea (STEM, del inglés: “Scanning Transmission Electron Microscopy”). A partir de estos electrones se construye la imagen con la ventaja de reducir el daño por radiación ya que el haz no es estacionario sino que se mueve barriendo la muestra.

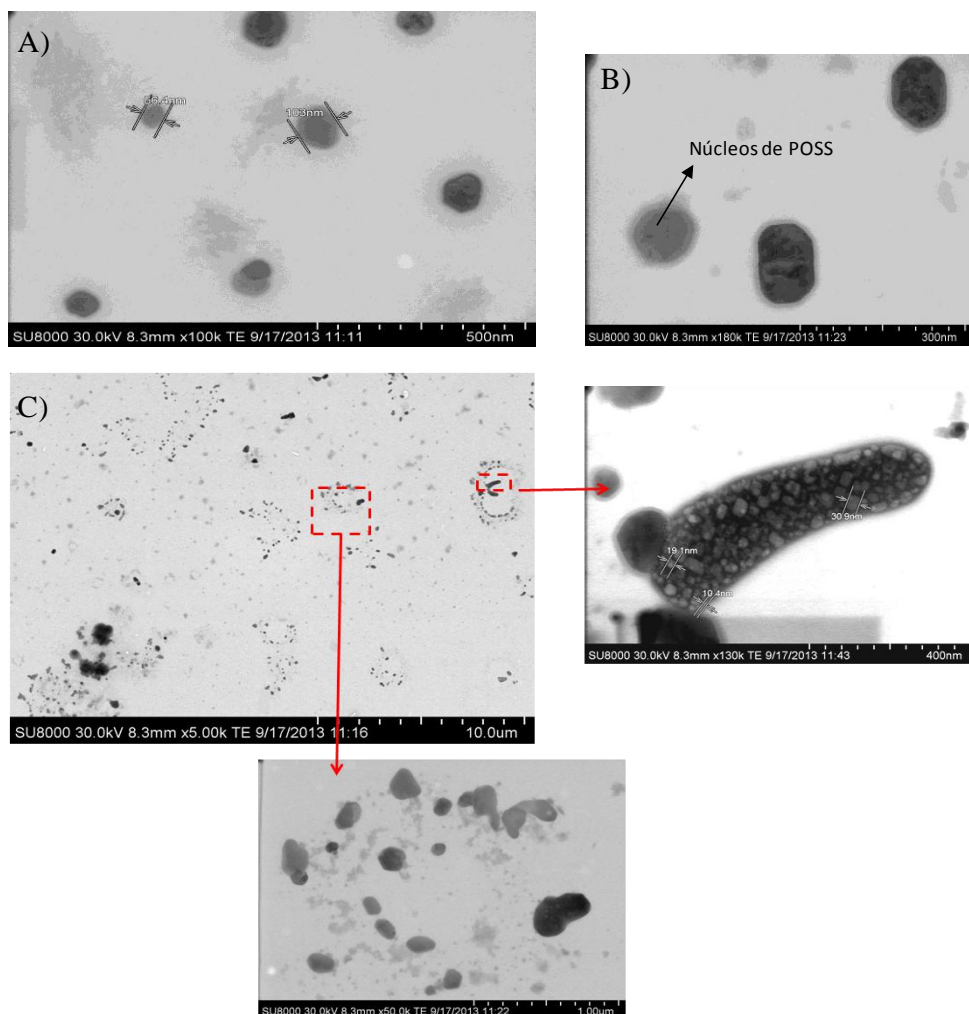
Se eligieron nuevamente los compuestos **39** y **42** como modelos para el estudio. Se prepararon ambos depositando 10  $\mu\text{L}$  de una disolución 5  $\mu\text{M}$  del compuesto sobre una rejilla de cobre con un tamaño de malla de 200 recubierta con Formvar® y estabilizada con carbono (Figura 6.26). Las muestras se secaron a presión atmosférica y posteriormente en un desecador a vacío durante 12 h.



**Figura 6.26** Rejillas para S-TEM.

En la imagen obtenida para **39** (7ManPropPOSS-BDP) se encontraron formaciones esféricas con un tamaño de alrededor de 20-50 nm de diámetro (Figura 6.27, A). Este tamaño debe corresponder a la agregación de varias unidades moleculares de POSS. Estas partículas se agrupan a su vez para formar estructuras mayores (varios cientos de nm) (Figura 6.27, C ampliación). Al tomar la imagen con mayor aumento, se observaron pequeños puntos oscuros en el interior, que podrían corresponder a los grupos de átomos de silicio de los armazones de POSS, ya que los cambios de densidad electrónica provocan un contraste diferente en el modo de transmisión (Figura 6.27, B). Esto ya había sido observado con anterioridad por otros autores en otros derivados de POSS.<sup>[10, 18a]</sup>

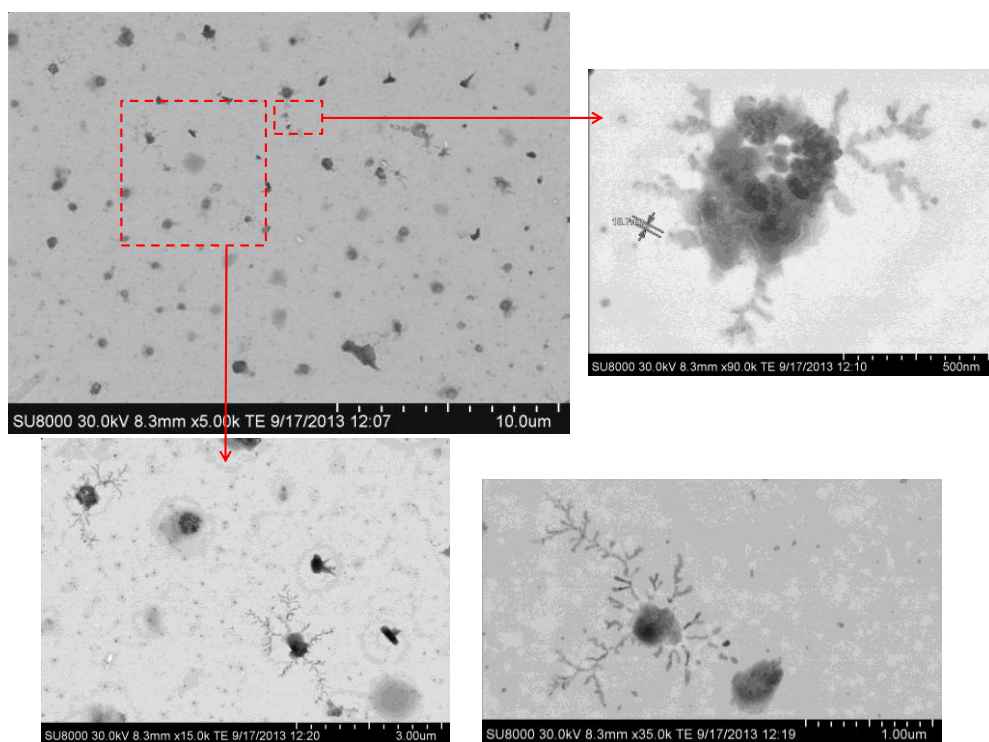
Se observaron agrupaciones esféricas mayoritariamente, pero también algunas formas poliédricas que son características de la formación de cristales (Figura 6.27, B). No es de extrañar que se dé un proceso de cristalización en el secado de las muestras, ya que el compuesto **39** es el que presenta el espaciador más corto que, al tener menos grados de libertad, puede cristalizar más fácilmente que los POSS de mayor tamaño y flexibilidad. Existen además precedentes en los que se han descrito estructuras cristalinas laminares formadas por ordenación de los núcleos de POSS en el interior de agregados en medio acuoso.<sup>[20a]</sup>



**Figura 6.27** Imágenes S-TEM del compuesto **39** a 30.0 kV. Aparecen señaladas las zonas ampliadas a más aumentos.



Para el compuesto de mayor tamaño **42**, se observan también formaciones esféricas de aproximadamente 20 nm que se agrupan para dar estructuras de 200-300 nm (Figura 6.28). En este caso, no se encontraron estructuras poliédricas porque esta molécula tiene los carbohidratos unidos a través de dos cadenas largas de TEG muy flexibles que proporcionan muchos grados de libertad y, por lo tanto, la cristalización es menos probable. Los agregados del dendrímero **42** se ordenan en unas estructuras de tipo dendrítico probablemente debido a una orientación preferente de sus cadenas, como si de un patrón fractal que se repite a varias escalas se tratase. Este tipo de conjuntos dendríticos se han descrito también muy recientemente en derivados de POSS monovalentes similares a nuestros sistemas que incorporan un péptido biológicamente activo y una molécula de fluoresceína como sonda fluorescente.<sup>[11a]</sup>



**Figura 6.28** Imágenes S-TEM del compuesto **42** a 30.0 kV. Aparecen señaladas las zonas ampliadas a más aumentos.

Al intentar tomar imágenes a mayor aumento, con una intensidad de haz de electrones más alta, se observó una especie de "fusión" de las diminutas estructuras



agregadas como si hubiera agua ocluida en el interior, probablemente absorbida entre las cadenas higroscópicas de TEG y atrapada en el interior de las micelas. Esto confirmaría, junto con el espectro de  $^1\text{H}$  RMN como se verá más adelante, la existencia de agua ocluida y que la agregación en MeOH que se observó por DLS, que *a priori* no debería ocurrir en ese medio, se debe posiblemente a esta pequeña cantidad de agua residual enlazada, que es suficiente como para promover el autoensamblaje de los cubos hidrofóbicos al disolver la muestra en MeOH.

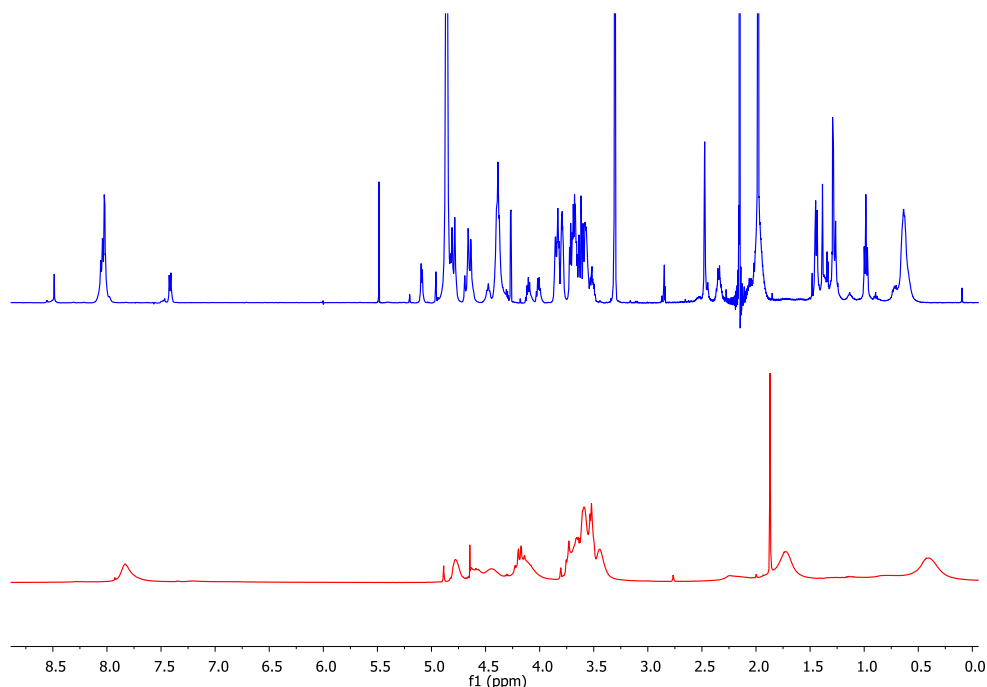
Se midieron también muestras diluidas de este compuesto (0,5 y 0,1  $\mu\text{M}$ ), en las que la aglomeración sucesiva de los agregados es más difícil. En estas muestras se apreció más claramente la formación de agregados más pequeños, de aproximadamente 20 nm. Se prepararon además muestras de ambos compuestos a partir de disoluciones en MeOH en las que no se observaron agregados en las medidas de DLS. Por S-TEM se observan formaciones más pequeñas que las encontradas en medio acuoso y muy heterogéneas. Probablemente estas estructuras se forman durante el proceso de secado y no corresponden realmente a la formación de agregados en disolución. Estos resultados están en consonancia con los encontrados por DSL.

Los diámetros medios determinados por DLS tienen siempre valores superiores a los medidos por S-TEM y AFM. La diferencia se debe probablemente a los distintos métodos de cálculo que se emplean en cada técnica. Así, la intensidad de las medidas de dispersión es proporcional a  $d^6$  ( $d$  = diámetro de la nanopartícula) mientras que en AFM y S-TEM la medida es directa y se hace un promedio en número sobre una muestra suficientemente amplia de partículas. Además, el hecho de que la medida se lleve a cabo sobre una muestra seca o en disolución afecta también a la distribución de tamaños, ya que en el caso de las muestras disueltas hay que considerar que se está midiendo el diámetro hidrodinámico con la correspondiente contribución de hinchamiento y solvatación.<sup>[24]</sup>

#### 6.2.5 Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN)

Se realizaron también experimentos de RMN utilizando el compuesto **39** (7ManPropPOSS-BDP), pero en este caso se analizó una muestra parcialmente protegida de **39** que contiene una pequeña proporción de grupos acetal protegiendo algunos dioles vecinales en las unidades de manosa para facilitar su disolución tanto en  $\text{D}_2\text{O}$  como en

CD<sub>3</sub>OD. El espectro de <sup>1</sup>H RMN en este último disolvente mostró señales muy bien resueltas en contraste con el de la misma muestra disuelta en D<sub>2</sub>O, que mostró señales muy ensanchadas para la mayoría de los protones debido a la formación de los agregados, con una rotación molecular más lenta y unos tiempos de relajación más cortos (Figura 6.29).

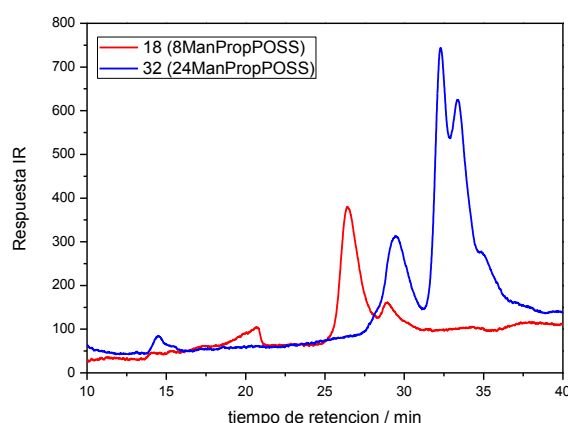


**Figura 6.29** Espectros de <sup>1</sup>H RMN (500 MHz) de **39** en CD<sub>3</sub>OD a  $c = 10$  mg/mL (azul) y en D<sub>2</sub>O a  $c = 5$  mg/mL (rojo) a temperatura ambiente.

#### 6.2.6 Cromatografía de permeación en gel (GPC)

Los compuestos **18** (8ManPropPOSS) y **32** (24ManPropPOSS) se estudiaron por cromatografía de permeación en gel para estudiar las diferencias entre los glico-POSS con 8 y 24 unidades de  $\alpha$ -D-manosa. Se seleccionaron los derivados sin marcador fluorescente para poder comparar sus cromatogramas con los obtenidos previamente para los correspondientes dendrímeros protegidos (Capítulo 4, Figura 4.15, Tabla 4.1). Se pretendía estudiar así si la agregación daba lugar a estructuras lábiles dinámicas, que se disgregaran rápidamente a su paso a través de la columna de GPC o si, por el contrario, se trata de estructuras suficientemente estables como para sobrevivir a la cromatografía. En este caso, nos permitiría además comprobar si la polidispersidad observada en las medidas de DLS se comparaba bien con la encontrada por esta técnica.

Los tamaños relativos de los glico-POSS medidos por GPC empleando H<sub>2</sub>O como eluyente y un detector de índice de refracción mostraron que el compuesto **18**, con 8 unidades de carbohidrato, muestra un tiempo de retención inferior al derivado con 21 unidades (compuesto **32**), al contrario de lo que cabría esperar en base a sus tamaños moleculares (el diámetro de **18** < **32** y por tanto al ser de menor tamaño debería presentar mayor tiempo de retención) (Figura 6.30). Además, ambos presentan un carácter multimodal que contrasta con los cromatogramas de los mismos compuestos protegidos y disueltos en THF, donde no hay agregación y se observaban distribuciones monomodales y monodispersas (Capítulo 4, Figura 4.15, Tabla 4.1). Todo ello sugiere que los agregados formados son lo suficientemente estables como para no ser disgregados, al menos no completamente, a su paso por la columna. Los agregados del dendrímero de 21 unidades de manosa (**32**) parecen ser de menor tamaño (mayor tiempo de elución) y más heterogéneos que los formados a partir del compuesto **18** octavalente, lo que apoya la hipótesis de que la agregación está íntimamente relacionada con el porcentaje de POSS hidrófobo con respecto a la masa total de la molécula y, por tanto, al ser éste porcentaje mayor para el compuesto **18**, es también mayor su tendencia a la formación de agregados más estables dando lugar a partículas de mayor tamaño que quedarían menos retenidas en la columna.



**Figura 6.30** Cromatogramas de GPC de los compuestos **18** y **32** empleando H<sub>2</sub>O como eluyente en columnas *PL-aquagel OH TM* (Polymer Laboratoires).

Los pesos moleculares obtenidos no son fiables ya que el calibrado se realizó con patrones de polisacárido Pullulan®, cuyas estructuras lineales difieren mucho de las estructuras globulares de nuestros sistemas. Por ello, se utilizaron los datos de GPC sólo a

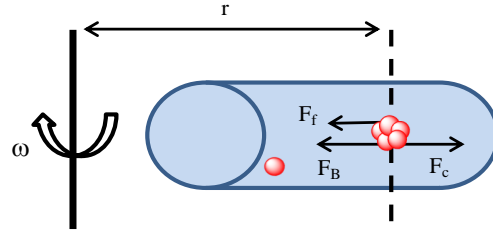
nivel cualitativo para comparar los tamaños relativos de los agregados de los distintos glico-POSS, como se ha explicado.

#### **6.2.7 Ultracentrifugación Analítica (AUC)**

Los estudios de ultracentrifugación que se describen en este apartado se realizaron en el laboratorio de Ultracentrifugación Analítica e Interacciones Macromoleculares del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC).

En una ultracentrífuga analítica, se monitoriza en tiempo real una muestra en disolución sometida a una fuerza centrífuga, mediante un sistema de detección óptica que emplea absorción de luz ultravioleta y/o interferencia óptica de índice de refracción para la detección. Esto permite observar el perfil de concentración de la muestra con respecto a la distancia al eje de rotación en función del campo centrífugo aplicado. Esta técnica permite caracterizar la distribución de tamaños y la conformación de las macromoléculas en disolución y, con ello, las posibles asociaciones supramoleculares. Los dos tipos de experimentos más habituales en AUC son los de equilibrio de sedimentación y los de velocidad de sedimentación. En nuestro caso, hemos usado el método de velocidad de sedimentación (SV) como aproximación para el estudio del proceso de agregación de nuestras moléculas en medio acuoso. El método SV es un método hidrodinámico en el que se mide la relación de transporte y se van separando las macromoléculas por fraccionamiento en función de su masa, forma y flotabilidad ante la fuerza centrífuga aplicada. Se eligió este método porque permite estudiar asociaciones fuertes que no reviertan el equilibrio de agregación durante el tiempo de la medida. El método proporciona los coeficientes de sedimentación y la masa de las especies sedimentadas lo que nos permitirá calcular a su vez el número promedio de moléculas de POSS que constituyen los agregados ( $N_{ag}$ ).<sup>[43]</sup>

Cuando se somete a las especies disueltas a una determinada velocidad angular  $\omega$ , éstas sufren el efecto de la fuerza centrífuga ( $F_c$ ), a la que se opone el empuje o flotabilidad ( $F_B$ ) y la fuerza de fricción entre la partícula y el líquido ( $F_f$ ), como se muestra esquemáticamente en la figura 6.31. Las partículas más uniformes y de mayor masa se desplazarán a una velocidad mayor hacia fondo de la cubeta (tienen un coeficiente de sedimentación  $S$  mayor).



**Figura 6.31** Diagrama de fuerzas en un experimento de velocidad de sedimentación en AUC.

La relación de transporte de una especie  $i$  ( $J_i$ ) centrifugada a la velocidad angular  $\omega$  viene dada por la ecuación de Lamm:

$$J_i = S_i w_i \omega^2 r - D_i dw_i / dr \quad (\text{Ec 6.3})$$

donde  $w_i$  es la concentración de la especie  $i$  (en peso/volumen),  $\omega$  es la velocidad angular del rotor (en radianes/s),  $r$  la posición radial de la especie  $i$ , y  $S_i$  y  $D_i$  son sus coeficientes de sedimentación y difusión, respectivamente. El coeficiente de sedimentación es una propiedad de la disolución que varía linealmente con la concentración y que puede determinarse experimentalmente mediante variaciones de absorbancia, interferencia / índice de refracción o radioactividad. Viene dado por la expresión:

$$S_i = M_i \cdot (1 - \bar{v} \rho_0) / N_A f_{\text{sed},i} \quad (\text{Ec 6.4})$$

donde  $M_i$  es la masa molecular,  $\bar{v}$  el volumen específico parcial,  $\rho_0$  la densidad del soluto,  $N_A$  el número Avogadro y  $f_{\text{sed},i}$  el coeficiente de fricción de la especie. El producto  $M_i \cdot (1 - \bar{v} \rho_0)$  se conoce como la masa molecular de flotación  $M_i^*$  (masa de fluido desplazada por la especie  $i$ ) por lo que la ecuación anterior (Ec. 6.4) puede reescribirse como:

$$S_i = M_i^* / N_A f_{\text{sed},i} \quad (\text{Ec 6.5})$$

El coeficiente de difusión viene dado por la expresión:

$$D_i = RT / N_A f_{\text{dif},i} \quad (\text{Ec 6.6})$$

donde  $R$  es la constante molar de los gases,  $T$  la temperatura absoluta y  $f_{\text{dif},i}$  el coeficiente friccional de difusión. En el límite ideal, los dos coeficientes de fricción  $f_{\text{sed}}$  y  $f_{\text{dif}}$  (de difusión y de sedimentación), que son dependientes del tamaño y de la forma de la molécula, son iguales y por tanto se pueden combinar ambas relaciones para obtener la

ecuación de Svedberg (Ecuación 6.7), en la que nos basaremos para estudiar nuestros agregados.

$$S_i/D_i = M_i^* / RT \quad (\text{Ec. 6.7})$$

Hemos estudiado por esta técnica tanto compuestos marcados con la sonda fluorescente (**39** (7ManPropPOSS), **40** (7ManTEGPOSS) y **42** (21ManTEGPOSS)), como compuestos no marcados (**32** (24ManPropPOSS) y **33** (24ManTEGPOSS)). Con las medidas de AUC hemos pretendido estudiar el mecanismo de agregación de forma cuantitativa, su dependencia con la concentración y la influencia de la sonda fluorescente en el mismo. Para ello, se midieron los coeficientes de sedimentación de las muestras a distintas concentraciones entre 0.5 y 2.5 mg/mL (Tabla 6.3). Para los dendrímeros no marcados, se empleó la interferencia como método de detección. En los compuestos marcados, además de interferencia, se realizaron las medidas midiendo la absorbancia del cromóforo a 440 ó 460 nm, dependiendo del compuesto. No se empleó el máximo de absorción de los mismos ya que a esas longitudes de onda se saturaba la señal del detector (la absorbancia medida debe ser inferior a 1.5). Así, con el sistema óptico de interferencia, al pasar un haz de luz láser por los dos sectores de la celda (sector de la referencia que contiene solo el tampón y sector de la muestra) se produce un patrón de interferencia. El patrón de interferencia es un patrón de franjas (Figura 6.32) que se desplazan según las diferencias en el índice de refracción entre la disolución de la muestra y la de referencia. A partir de ese desplazamiento se puede calcular la concentración de la muestra sedimentada a lo largo de la celda de la muestra.



**Figura 6.32** Patrón de interferencia en un experimento de velocidad de sedimentación.<sup>[44]</sup>

Para asegurarnos de que no hubiera interferencias de ningún proceso de hidrólisis y reordenamiento/polimerización del armazón de silsesquioxano, se llevaron a cabo las medidas en medio ácido tamponado a pH 5.25 con AcOH/AcONa 0.1 M, condiciones en las que habíamos comprobado con anterioridad que la estructura de POSS es estable. Se

repitieron los ensayos en H<sub>2</sub>O milliQ en tiempos inferiores a 3 horas (para evitar procesos de hidrólisis) ya que el perfil de sedimentación obtenido en ausencia de sales estaba mejor resuelto. Es decir, las curvas gaussianas correspondientes a cada fracción separada por la centrifugación tienen un ensanchamiento difusional menor y pueden desconvolucionarse más fácilmente en agua pura que en medio tamponado salino. Se ensayaron distintas velocidades del rotor entre 20 y 48 Krpm, optimizando una velocidad de 38 Krpm para el compuesto de menor tamaño **39** (7ManPropPOSS-BDP) y de 48 Krpm para el resto de compuestos.

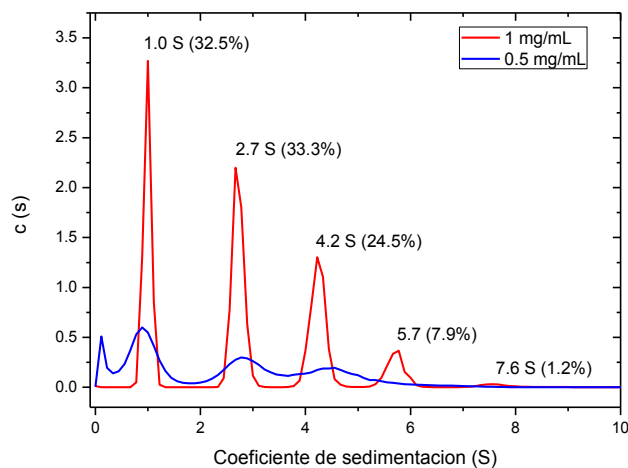
Se estimaron los volúmenes específicos parciales ( $\bar{v}$ ), definidos como el cociente entre el volumen molar y el peso molecular de cada especie. Estos valores se calcularon considerando la fórmula molecular del compuesto y el tanto por ciento en masa del cubo de silsesquioxano (%(SiO<sub>1.5</sub>)<sub>8</sub>) en relación a la masa molecular del compuesto (Tabla 6.1). Se corrigieron los datos a partir de los valores de densidad y viscosidad del agua a 20 °C y a la temperatura experimental, que son bien conocidos, y la densidad y viscosidad a estas dos temperaturas del tampón empleado. Estos últimos valores pueden calcularse a partir de los incrementos en densidad y viscosidad del agua para cada uno de los componentes del tampón, en función de su concentración, mediante el programa SEDNTERP.

**Tabla 6.1** Volúmenes específicos parciales estimados para los distintos compuestos.

Glico-POSS	Fórmula molecular	M <sub>w</sub>	%(SiO <sub>1.5</sub> ) <sub>8</sub>	$\bar{v}_{\text{bar}}$ <sup>[b]</sup>
<b>39</b> (7ManPropPOSS-BDP) <sup>[a]</sup>	C <sub>112</sub> H <sub>173</sub> BF <sub>2</sub> N <sub>26</sub> O <sub>54</sub> Si <sub>8</sub>	3021.6768	13.8	0.5752
<b>40</b> (7ManTEGPOSS-BDP) <sup>[a]</sup>	C <sub>168</sub> H <sub>285</sub> BF <sub>2</sub> N <sub>26</sub> O <sub>54</sub> Si <sub>8</sub>	4254.6773	9.8	0.5844
<b>42</b> (21ManTEGPOSS-BDP) <sup>[a]</sup>	C <sub>518</sub> H <sub>894</sub> BF <sub>2</sub> N <sub>89</sub> O <sub>257</sub> Si <sub>8</sub>	12754.5749	3.3	0.5994
<b>32</b> (24ManPropPOSS)	C <sub>496</sub> H <sub>856</sub> N <sub>96</sub> O <sub>260</sub> Si <sub>8</sub>	12541.4865	3.3	0.5992
<b>33</b> (24ManTEGPOSS)	C <sub>560</sub> H <sub>984</sub> N <sub>96</sub> O <sub>292</sub> Si <sub>8</sub>	13950.3254	3.0	0.5889

<sup>[a]</sup> El cromóforo no se ha tenido en cuenta en el cálculo de  $\bar{v}_{\text{bar}}$ . <sup>[b]</sup> Expresado en cm<sup>3</sup>/g.

Los coeficientes de sedimentación (*S*) se miden como la velocidad de desplazamiento de las distintas especies en el campo de la fuerza centrífuga. Así, la distribución de coeficientes de sedimentación observados por interferencia para el compuesto **39** se muestra gráficamente a modo de ejemplo en la Figura 6.33. En ella se incluyen los coeficientes de sedimentación de cada especie detectada junto con el tanto por ciento de cada una con respecto al total de los sedimentos. Los coeficientes de sedimentación medidos para el resto de compuestos aparecen recogidos en la Tabla 6.2.



**Figura 6.33** Distribución de coeficientes de sedimentación en sverdbergs ( $S = 10^{-13}$  s) del compuesto **39** en agua a dos concentraciones.

El análisis de los perfiles de sedimentación obtenidos se realizó mediante el ajuste directo de los perfiles a los conjuntos de soluciones de la ecuación de Lamm (Ec 6.3), que puede reescribirse como:

$$\frac{dw}{dt} = \frac{1}{r} \cdot \frac{d}{dr} \left( rD \frac{dw}{dr} - S\omega^2 r^2 w \right) \quad (\text{Ec.6.8})$$

donde  $w$  es la concentración (peso/volumen) en una determinada posición y tiempo ( $w(r,t)$ ). El ajuste de los perfiles de sedimentación a las soluciones de la ecuación de Lamm no emplea valores discretos de los coeficientes de sedimentación sino distribuciones de los mismos ( $c(s)$ ). Para ello se empleó el método “ $c(s)$ ” descrito por Schuck<sup>[45]</sup> implementado en el software SEDFIT 14.1 que representa la concentración inicial de especies que sedimentan con un coeficiente de sedimentación  $S$ .



**Tabla 6.2** Coeficientes de sedimentación ( $S$ ) determinados por AUC y números de agregación ( $N_{ag}$ ) estimados a partir de los mismos.

	$C^{[a]}$	Modo <sup>[b]</sup>	$S$	$S_{promedio}^{[c]}$	Relación friccional	$D \text{ (m}^2/\text{s)}^{[d]}$	M (KDa)	$N_{ag}$
<b>39</b>	1.0	IP	1.0 S (32.5 %) 2.7 S (33.3 %) 4.2 S (24.5 %) 5.7 S (7.9 %) 7.6 S (1.2 %)	2.80	1.4617	$2.45 \cdot 10^{-12}$	653	216
	0.5	IP	0.9 S (39.4 %) 2.9 S (31.4 %) 4.4 S (23.1 %) 5.7 S (6.1 %)	2.63	1.8624		614	203
	0.5	RA 460 nm	1.4 S (35.1 %) 3.1 S (27.5 %) 4.5 S (29.6 %) 5.9 S (7.9 %)	3.14	1.6423		733	242
<b>40</b>	1.0	IP	1.2 S (59.0 %) 2.3 S (37.6 %) 3.8 S (3.3 %)	1.70	1.8470	$2.17 \cdot 10^{-12}$	458	112
	1.0	RA 440 nm	1.5 S (66.6 %) 2.7 S (31.5 %) 5.4 S (1.9 %)	1.95	1.8675		525	123
<b>42</b>	2.5	IP	1.4 S (78.0 %) 2.7 S (16.8 %) 5.1 S (4.6 %) 7.2 S (0.5 %)	1.82	1.8674	$1.80 \cdot 10^{-12}$	612	48
	2.5	RA 440 nm	1.9 S (84.4 %) 3.9 S (11.8 %) 6.2 S (3.8 %)	2.30	2.1042		774	60
	1.2	IP	1.2 S (60.4 %) 2.2 S (30.6 %) 4.1 S (8.0 %) 6.5 S (1.1 %)	1.80	1.9436		606	47
	1.2	RA 440 nm	2.0 S (80.3 %) 3.9 S (15.0 %) 6.4 S (4.5 %)	2.48	2.1556		835	65
<b>32</b>	2.5	IP	1.5 S (89.7 %) 3.5 S (8.0 %) 6.7 S (2.4 %)	1.79	1.6053	$1.53 \cdot 10^{-12}$	709	56
	1.2	IP	1.5 S (81.8 %) 3.2 S (14.3 %) 6.3 S (2.1 %) 6.9 S (1.8 %)	1.94	1.6767		768	61

**Continuación Tabla 6.2** Coeficientes de sedimentación ( $S$ ) determinados por AUC y números de agregación ( $N_{ag}$ ) estimados a partir de los mismos.

	$C^{[a]}$	Modo <sup>[b]</sup>	$S$	$S_{promedio}^{[c]}$	Relación friccional	$D$ ( $m^2/s$ ) <sup>[d]</sup>	$M$ (KDa)	$N_{ag}$
<b>33</b>	2.5	IP	0.8 $S$ (33.5 %) 1.6 $S$ (64.4 %) 3.6 $S$ (3.0 %)	1.37	1.9572	$1.80 \cdot 10^{-12[e]}$	450	32
	1.2	IP	0.9 $S$ (47.3 %) 1.8 $S$ (51.5 %) 4.6 $S$ (1.5 %)	1.42	2.0461		466	33

[a] Concentración expresada en mg/mL. [b] Indica el modo de detección empleado, IP : interferencia, RA: absorbancia a la longitud de onda especificada. [c] El valor de  $S$  promedio se calculó realizando la media ponderada. [d] El valor del coeficiente de difusión se tomó de los experimentos de DLS. [e] Se aproximó considerando el mismo valor de  $D$  que para el compuesto equivalente con etiqueta fluorescente **42**.

El método “ $c(s)$ ” permitió realizar una estimación del peso de cada agregado en KDa considerando los valores de volumen específico parcial  $\bar{v}_{bar}$  (Tabla 6.1) y las relaciones friccionales, que contienen información acerca de la forma y tamaño del agregado (Tabla 6.2). Sin embargo, se obtuvieron así pesos muy inferiores a los esperados a la vista de los resultados obtenidos por otras técnicas, en las que parecen formarse agregados de cientos de nanómetros (por ejemplo, para el compuesto **39** se estimaron pesos de 3.6 a 77 KDa y para el compuesto **42** de 10 a 114 KDa). Se analizaron detenidamente las relaciones de fricción estimadas para cada compuesto (Tabla 6.3), que resultaron ser valores muy altos (se considera que para una esfera perfecta la relación friccional es de 1.2).<sup>[46]</sup> Los elevados valores obtenidos (entre 1.46 y 2.16) pueden deberse a una desviación de la esfericidad de nuestros agregados debido a que se trata de estructuras en estrella ramificadas que presentarán mucho más rozamiento del esperado para una molécula compacta de la misma masa. Además, podrían incrementarse aún más debido al espacio vacío en el interior de los agregados, que no parecen ser demasiado compactos. Estas relaciones friccionales estarían falseando los resultados, de forma que los valores de masa estimados para los agregados aparentarían ser menores de lo que son en realidad. Por ello, combinando la información obtenida por DLS (coeficientes de difusión) con la obtenida por AUC (coeficientes de sedimentación), se realizó el cálculo de la masa del agregado sustituyendo ambos valores directamente en la ecuación de Svedverg (Ecuación 6.7). Se calculó así la masa de cada agregado separado por fragmentación en la centrífuga y, considerando la masa molecular, se calculó el número de moléculas promedio que componían los agregados de cada especie ( $N_{ag}$ ) (Tabla 6.2).

Se observó que el número de agregación es prácticamente independiente de la concentración y del método de detección empleado (Tabla 6.2). Además se confirmó que la

agregación está íntimamente relacionada con el porcentaje hidrófobo de la molécula, entendiendo por tal el porcentaje del armazón inorgánico de POSS con respecto a la masa molecular total. Se puede concluir de estos resultados que la agregación en medio acuoso está gobernada principalmente por interacciones hidrofóbicas debidas a la estructura de silsesquioxano de forma que en general se incorpora un mayor número de moléculas en el agregado cuanto mayor es el porcentaje de POSS de la molécula ( $N_{ag}$ , Tabla 6.3). Esta misma tendencia ya había sido observada previamente por otros autores en esferosilicatos cúbicos sustituidos con cadenas de polietilenglicol, similares a nuestros POSS.<sup>[18a]</sup>

**Tabla 6.3** Relación entre el porcentaje en masa del núcleo del POSS y el número de agregación ( $N_{ag}$ ).

Entrada	glico-POSS <sup>[a]</sup>	%( $\text{SiO}_{1.5}$ ) <sub>8</sub>	$N_{ag}$
1	<b>39</b> (7ManPropPOSS-BDP)	13.8	216
2	<b>40</b> (7ManTEGPOSS-BDP)	9.8	112
3	<b>42</b> (21ManTEGPOSS-BDP)	3.3	47
4	<b>32</b> (24ManPropPOSS)	3.3	61
5	<b>33</b> (24ManTEGPOSS)	3.0	33

<sup>[a]</sup> Concentraciones de glico-POSS: 1.0 - 1.2 mg/mL.

Comparando los glico-POSS equivalentes con y sin marcador fluorescente (**42/33**, entradas 3 y 5, respectivamente) se encuentra que, para un mismo espaciador, el compuesto con BODIPY incorpora más unidades de glico-POSS al agregado. Esto es debido posiblemente al menor número de unidades de carbohidrato de **42** y la presencia del BODIPY, de carácter lipófilo y que contribuye, junto con el POSS, a la hidrofobia total de la molécula y por tanto al autoensamblaje en medio acuoso.

### 6.2.8 Estudio fotofísico de la agregación

Se estudió la fotofísica de todos los glico-POSS de  $\alpha$ -D-manosa marcados con BODIPY como sonda fluorescente. Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Profesor Íñigo López Arbeloa y la Dra. Virginia Martínez en el Laboratorio de Espectroscopía Molecular del Departamento de Química Física de la Universidad del País Vasco. Para ello, se realizó un estudio comparativo de los derivados protegidos, solubles en medio orgánico, y los desprotegidos, solubles en medio acuoso. Se estudiaron además todos los sistemas empleando MeOH como disolvente común para poder comparar ambos grupos

de compuestos. En la Tabla 6.4 se indica la numeración de los compuestos estudiados en este apartado y su clasificación en estos tipos.

**Tabla 6.4** Compuestos para el estudio fotofísico.

	Protegido	Desprotegido
7ManPropPOSS-BDP	<b>35</b>	<b>39</b>
7ManTEGPOSS-BDP	<b>36</b>	<b>40</b>
21ManPropPOSS-BDP	<b>37</b>	<b>41</b>
21ManTEGPOSS-BDP	<b>38</b>	<b>42</b>

Se abordó en primer lugar el estudio fotofísico de los compuestos protegidos solubles en medio orgánico. En Capítulo 2 se realizó un estudio detallado para ver cómo afectaba la unión a POSS a las propiedades emisoras del cromóforo. Se concluyó que el anclaje al POSS no modifica la longitud de onda de absorción ni de emisión del cromóforo, ni tampoco su rendimiento cuántico de fluorescencia ni su eficiencia láser y que, sin embargo, se incrementa su estabilidad fotofísica considerablemente.<sup>[47]</sup> Este incremento de estabilidad, debido al carácter híbrido del POSS que favorece la disipación térmica, permitió la aplicación del compuesto **40** como sonda fluorescente en bioimagen como se describió en el Capítulo 4.

Los derivados protegidos (**35-38**) se estudiaron en varios disolventes orgánicos para determinar la influencia de la polaridad del medio sobre sus propiedades fotofísicas. (Tabla 6.5).

**Tabla 6.5** Propiedades fotofísicas de los glico-POSS protegidos a una concentración  $2 \times 10^{-6}$  M en distintos disolventes, donde  $\lambda_{\text{abs}}$  es la longitud de onda de absorción ( $\pm 0.5$  nm);  $\epsilon_{\text{max}}$  es el coeficiente de absorción molar;  $\lambda_{\text{flu}}$  es a longitud de onda de emisión de fluorescencia ( $\pm 0.5$  nm);  $\phi$  el rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi/\pm 0.05$ );  $\tau$  el tiempo de vida del estado excitado ( $\tau/\pm 0.05$  ns);  $k_{\text{f}}$  la constante de desactivación por fluorescencia,  $k_{\text{nr}}$  la constante de desactivación por vías no radiativas; y  $\Delta\nu_{\text{St}}$  el desplazamiento de Stokes.

	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{max}}$ ( $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{flu}}$ (nm)	$\phi$	$\tau$ (ns)	$k_{\text{f}}$ ( $10^8 \text{ s}^{-1}$ )	$k_{\text{nr}}$ ( $10^8 \text{ s}^{-1}$ )	$\Delta\nu_{\text{St}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>35</b>								
AcOEt	522.5	5.9	536.0	0.62	4.85 <sup>[a]</sup>	1.3	0.78	480
acetona	522.5	5.9	537.0	0.56	4.59 <sup>[a]</sup>	1.2	0.96	515
MeOH	523.0	5.9	538.0	0.56	4.83 <sup>[a]</sup>	1.2	0.91	535
<b>36</b>								
AcOEt	523.0	4.8	536.0	0.66	5.14	1.28	0.66	465
acetona	523.0	4.3	536.0	0.57	4.95	1.15	0.87	470
MeOH	523.5	4.8	537.0	0.52	5.22	1.00	0.92	480
<b>37</b>								
AcOEt	523.0	6.8	537.0	0.58	5.25	1.1	0.80	500
acetona	523.0	7.4	537.0	0.51	4.86	1.1	1.0	500
MeOH	523.5	7.3	538.0	0.54	5.43	0.99	0.85	515
<b>38</b>								
AcOEt	523.0	5.3	536.0	0.64	5.33 <sup>[a]</sup>	1.2	0.67	465
acetona	523.0	5.4	536.0	0.60	4.99 <sup>[a]</sup>	1.2	0.80	465
MeOH	523.5	5.2	538.0	0.60	5.49 <sup>[a]</sup>	1.1	0.73	515

<sup>[a]</sup> Con una componente de crecimiento (fenómenos de rotación).<sup>[48]</sup>

Comparando las propiedades de esta serie de compuestos protegidos, se observa un ligero aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi_{35} = 0.62$  vs  $\phi_{36} = 0.66$  y  $\phi_{37} = 0.58$  vs  $\phi_{38} = 0.64$ ) en disolventes apolares como el acetato de etilo al aumentar la longitud del espaciador para un mismo número de unidades de carbohidrato. Este hecho podría deberse a que las cadenas del espaciador restringen estéricamente el giro del cromóforo BODIPY obstaculizando así su desactivación por vías no radiativas, como muestran las constantes no radiantes medidas ( $k_{\text{nr } 37} = 0.80 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$  vs  $k_{\text{nr } 38} = 0.67 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ ).

Se ha observado previamente que los BODIPYs tienden a disminuir ligeramente su rendimiento cuántico en medios polares (por ejemplo, para el compuesto **36**,  $\phi = 0.66$  en acetato de etilo y disminuye a 0.52 en metanol). Este efecto parece ser un fenómeno general que ocurre también con otros fluoróforos y que es particularmente acusado en el caso de disolventes próticos, efecto que se ha atribuido a la contribución de un mecanismo de decaimiento no radiante que opera selectivamente en los disolventes dadores de enlace de hidrógeno.<sup>[49]</sup> Sin embargo, en las muestras con mayor longitud de espaciador y mayor número de cadenas (**37** y **38**), este efecto es mucho menos pronunciado debido probablemente a que las cadenas de tetraetilenglicol que envuelven al BODIPY actúan

como si fueran un codisolvente aprótico, disminuyendo así las interacciones intermoleculares con el disolvente polar. Se descartó en todos los casos que hubiera ningún tipo de agregación entre los cromóforos en disolventes orgánicos (ver más adelante). El anclaje del cromóforo al POSS y la presencia de los carbohidratos no afecta de forma significativa a la fotofísica del BODIPY.

Los compuestos desprotegidos **39-42** se analizaron tanto en MeOH como en medio acuoso (H<sub>2</sub>O milliQ o disolución tampón de AcOH/AcONa 0.1 M a pH 5.25, para garantizar que no haya procesos colaterales de hidrólisis de los armazones de POSS). Se pudieron comparar así las propiedades de todos los compuestos en MeOH para estudiar el efecto de la desprotección de los carbohidratos sobre la fotofísica del cromóforo (Tabla 6.6). Aunque las longitudes de onda de absorción y emisión, y por tanto los desplazamientos de Stokes, prácticamente no varían al desproteger los carbohidratos, los rendimientos cuánticos de fluorescencia sí que se ven muy afectados, observándose una disminución de los mismos. Esta disminución es mucho más acusada en los glico-POSS de menor tamaño **35** y **36**, que reducen su rendimiento cuántico de 0.56 a 0.33 y de 0.52 a 0.42, respectivamente, al ser desprotegidos. Los dendrímeros de mayor tamaño (**37** y **38**), sin embargo, sólo disminuyen un 17% su capacidad de emisión ( $\phi$  pasa de 0.54 a 0.45 y de 0.60 a 0.50, respectivamente). Esto se puede explicar de nuevo por la longitud y número de cadenas de TEG que rodean al colorante. El grupo protector de los hidroxilos, isopropiliden acetal, provee al colorante de un microentorno orgánico y apolar, incluso cuando está disuelto en MeOH, que favorece su emisión. Al desproteger los hidroxilos, el BODIPY queda más expuesto al medio prótico<sup>[49]</sup> y disminuye su emisión, como ya se ha explicado. En el caso de los dendrímeros con 21 carbohidratos, la longitud y densidad de cadenas es superior, por lo que a pesar de la eliminación de los grupos acetal en la desprotección de los carbohidratos, el microentorno del cromóforo es todavía lo suficientemente “apolar” como para que su rendimiento cuántico de fluorescencia se vea menos afectado. Se podría decir que las cadenas espaciadoras entre los carbohidratos y el POSS “protegen” la emisión del cromóforo.

**Tabla 6.6** Comparación entre las propiedades fotofísicas de los glico-POSS protegidos y libres en disolución  $2 \times 10^{-6}$  M en MeOH

	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{max}}$ ( $10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{flu}}$ (nm)	$\phi$	$\tau$ (ns)	$k_{\text{fl}}$ ( $10^8 \text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{nr}}$ ( $10^8 \text{s}^{-1}$ )	$\Delta\nu_{\text{St}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>35</b> (p) <sup>[a]</sup>	523.0	5.9	538.0	0.56	4.83	1.20	0.91	535
<b>39</b>	523.0	4.9	538.0	0.33	5.04	0.65	1.30	535
<b>36</b> (p)	523.5	4.8	537.0	0.52	5.22	1.00	0.92	480
<b>40</b>	523.5	4.9	538.0	0.42	4.88	0.86	1.20	515
<b>37</b> (p)	523.5	7.3	538.0	0.54	5.43	0.99	0.85	515
<b>41</b>	523.5	5.4	538.0	0.45	5.41	0.83	1.00	515
<b>38</b> (p)	523.5	5.2	538.0	0.60	5.49	1.10	0.73	515
<b>42</b>	523.5	5.7	536.0	0.50	5.44	0.92	0.92	445

<sup>[a]</sup> Para mayor claridad, (p) denota a los compuestos con los grupos hidroxilo protegidos como acetales.

Al disolver los glico-POSS desprotegidos en medios acuosos, aún más polares que el MeOH, el comportamiento fotofísico cambia (Tabla 6.7), lo que puede ser interpretado como una consecuencia del fenómeno de autoensamblaje de estos sistemas, que hemos descrito a lo largo este capítulo. De nuevo, al aumentar la polaridad del medio se produce una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia, tanto más acusado cuanto menor es la longitud y densidad de las cadenas de espaciador entre el POSS y los carbohidratos. Existen antecedentes similares en la bibliografía en los que se describe que las cadenas de polietilenglicol parecen proporcionar un microentorno favorable para la emisión de otras sondas fluorescentes como los perilenos.<sup>[50]</sup>

**Tabla 6.7** Propiedades fotofísicas de los glicoPOSS desprotegidos a una concentración  $2 \times 10^{-6}$  M.

	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{max}}$ ( $10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{flu}}$ (nm)	$\phi$	$\tau$ (ns)	$k_{\text{fl}}$ ( $10^8 \text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{nr}}$ ( $10^8 \text{s}^{-1}$ )	$\Delta\nu_{\text{St}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b>39</b>								
metanol	523.0	4.9	538.0	0.33	5.04	0.65	1.3	535
pH 5	526.0	3.3	541.0	0.19	6.64 <sup>[a]</sup>	0.29	1.2	530
H <sub>2</sub> O milliQ	526.0	4.0	542.0	0.18	6.60 <sup>[a]</sup>	0.27	1.2	560
<b>40</b>								
metanol	523.5	4.9	538.0	0.42	4.88	0.86	1.2	515
pH 5	526.5	3.9	542.0	0.36	6.74	0.53	0.95	545
<b>41</b>								
metanol	523.5	5.4	538.0	0.45	5.41	0.83	1.0	515
pH 5	527.0	4.8	542.0	0.43	7.23	0.59	0.79	525
<b>42</b>								
metanol	523.5	5.7	536.0	0.50	5.44	0.92	0.92	445
pH 5	527.0	5.3	542.0	0.52	7.22	0.72	0.66	525

<sup>[a]</sup> Con una componente de crecimiento (fenómenos de rotación).

Sin embargo, el cambio más llamativo al evaluar las propiedades en medio acuoso es el incremento del tiempo de vida de fluorescencia, que se alarga debido probablemente al fenómeno de agregación. Es decir, al haber partículas de cientos de nanómetros en el medio, se produce un fenómeno de dispersión de la luz que alarga el camino óptico del fotón hasta el detector. De esta forma, los fotones dispersados tardarán más en llegar al detector provocando un alargamiento del tiempo de vida medido. Así, al pasar de MeOH a agua, se registraron incrementos del tiempo de vida de fluorescencia de 1.14, 1.86, 1.82 y 1.78 ns para los compuestos **39-42**, respectivamente. Para comprobar esta hipótesis, que atribuye el incremento del tiempo de vida observado a fenómenos de dispersión de luz, se realizaron medidas en un fluorímetro equipado con un detector de esfera integradora. Previamente hay que mencionar que la esfera integradora está diseñada para determinar rendimientos cuánticos de fluorescencia y no para medir tiempos de vida de fluorescencia. La esfera no corrige la dispersión, sino todo lo contrario, trabaja de tal modo que gracias a su superficie totalmente reflectante recoge la luz dispersada en todas las direcciones para obtener así la absorbancia absoluta. Por ello, es de suma importancia que la muestra y su referencia (ver más abajo), tengan el mismo tamaño y concentración de las partículas. Si en el sistema a estudiar se dan procesos de dispersión, debe de haber una diferencia entre las medidas en disolución detectadas en ángulo recto y en esfera integradora, mientras que en ausencia de dispersión ambas medidas deberían coincidir. Para estas medidas, se han seleccionado como referencias Ludox® (suspensión coloidal de SiO<sub>2</sub>) o, alternativamente, partículas de glico-POSS sin colorante (compuesto **18**, 8ManPropPOSS).



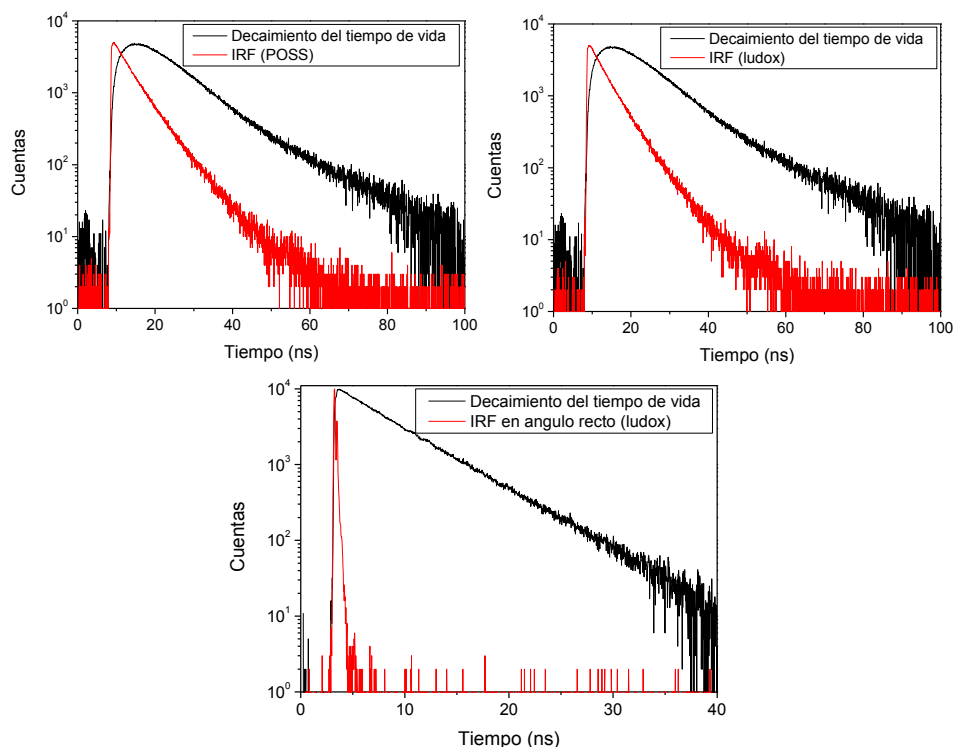
Se determinó el tiempo de vida del compuesto **40** (7ManTEGPOSS-BDP) con la esfera integradora, tanto en metanol como en disolución acuosa tamponada a pH 5.0. Se apreció un efecto inmediato de alargamiento del tiempo de vida en las medidas llevadas a cabo con la esfera, como sería de esperar para una mayor contribución de la dispersión. De hecho, tal y como se muestra en la Figura 6.34, se registró un ensanchamiento considerable en el perfil del IRF(t) (respuesta de la función instrumental al pulso de excitación),<sup>[51]</sup> como consecuencia de la elongación del camino óptico de la dispersión registrada en la esfera. Por lo tanto, el ensanchamiento del IRF obtenido en la esfera demuestra que, aunque no es un método adecuado para determinar tiempos de vida, sí que nos permite validar la interpretación de los mismos en base a la agregación de las partículas de POSS.

Se han registrado dos IRF: uno con el scatter convencional (ludox) y otro con las partículas de glico-POSS sin colorante (compuesto **18**, 8ManPropPOSS), que dieron exactamente la misma respuesta (Figura 6.34). Como la esfera recoge toda la luz dispersada, se registró un considerable aumento del tiempo de vida con respecto a la medida realizada en ángulo recto (Tabla 6.8).

**Tabla 6.8** Medidas del tiempo de vida de fluorescencia en distintas condiciones.

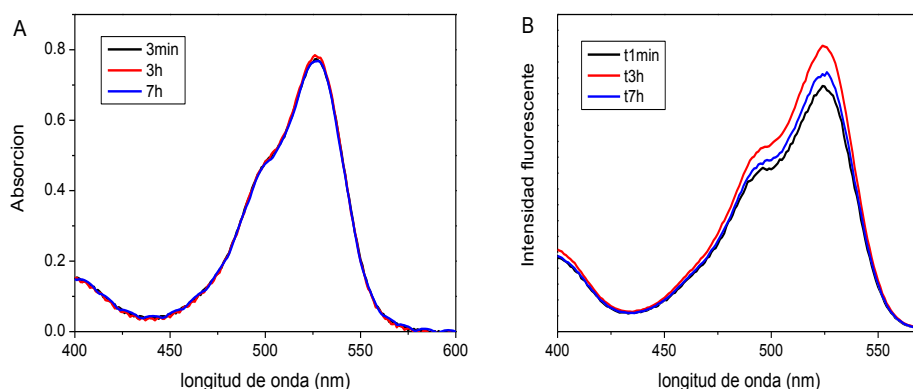
Láser	<b>40</b> (7ManTEGPOSS-BDP)	$\tau_{\text{flu}}$ (ns) 90°	$\tau_{\text{flu}}$ (ns) Esfera
Fianium ( $\lambda_{\text{exc}} = 500$ nm)	metanol	4.9	
	agua milliQ	6.7	
Diodo ( $\lambda_{\text{exc}} = 470$ nm)	metanol	5.2	~ 7
	tampón pH = 5	6.9	~ 9

Se observa un alargamiento similar del tiempo de vida del glico-POSS **40** en MeOH<sup>[52][53]</sup> medido en la esfera (en torno a 7 ns) con respecto a la medida realizada sin esfera en ángulo recto (en torno a 5 ns), lo que nos permite atribuir el mayor tiempo de vida registrado en agua a la mayor dispersión de la luz producida por la agregación de la muestra (Tabla 6.8). De este modo, podríamos afirmar que el aumento del tiempo de vida de fluorescencia registrado en ángulo recto de todas las muestras desprotegidas en agua con respecto a las muestras medidas en metanol (de +1.6 ns de media), podría deberse al aumento de la dispersión producida por las partículas de agregados de las muestras que se forman en medio acuoso y que afectaría a la medida experimental.



**Figura 6.34** Arriba: comparación del IRF de los patrones de dispersión (ludox y POSS **18**) con el láser de diodo a 470 nm en la evaluación del tiempo de vida de **39** en agua mediante esfera integradora. Abajo: Evaluación del tiempo de vida de **39** en ángulo recto. Al no registrarse la dispersión del patrón, la respuesta instrumental (rojo) es más estrecha.

Si la agregación ocurre por interacciones hidrofóbicas de los armazones inorgánicos de POSS, sería necesario aclarar qué ocurre con el BODIPY en este proceso, es decir ¿los cromóforos también se agregan entre sí? Para ello, se registró el espectro de excitación de uno de los compuestos a distintos tiempos comprobándose que se conservan sus curvas espectrales de absorción y que, por tanto, los cromóforos no se agregan entre sí (Figura 6.35).



**Figura 6.35** Espectros de absorción (A) y excitación (B) del compuesto **39** en disolución 20  $\mu\text{M}$  en medio acuoso a pH 4 ( $\lambda_{\text{emisión}} = 580 \text{ nm}$ ).

Por último, se evaluó la anisotropía de fluorescencia resuelta en el tiempo mediante el registro de las curvas de decaimiento fluorescente con luz linealmente polarizada. Este método permite calcular el tiempo de rotación del cromóforo. Los tiempos de rotación se ajustaron a una función de decaimiento exponencial, o bien se desconvolucionaron a dos exponenciales como se muestra en la Tabla 6.9.

**Tabla 6.9** Tiempos de rotación obtenidos de la anisotropía resuelta en tiempo ( $\theta \pm 0.05\text{ns}$ ).

Compuesto	Disolvente	Mono $\theta_{\text{rot}}$ (ns)	Biexponencial $\theta_2, \theta_1$ (ns)
<b>36</b> (p-7ManTEGPOSS-BDP)	acetato etilo <sup>[a]</sup>	0.56	0.44 (80%) 1.20 (20%)
	metanol <sup>[a]</sup>	0.48	0.44 (94%) 1.45 (6%)
<b>39</b> (7ManPropPOSS-BDP)	agua <sup>[b]</sup>	1.40	0.50 (28%) 1.70 (72%)
<b>40</b> (7ManTEGPOSS-BDP)	agua <sup>[b]</sup>	1.52	0.50 (37%) 2.10 (63%)
	agua (pH 5) <sup>[a]</sup>	1.76	0.80 (48%) 3.00 (52%)
	metanol <sup>[a]</sup>	0.58	0.50 (88%) 1.40 (12%)
<b>41</b> (21ManPropPOSS-BDP)	metanol <sup>[a]</sup>	0.81	-
	agua <sup>[a]</sup>	3.40	-
<b>42</b> (21ManTEGPOSS-BDP)	metanol <sup>[a]</sup>	0.53	-
	agua <sup>[a]</sup>	2.50	-

<sup>[a]</sup> Láser de diodo ( $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$ ). <sup>[b]</sup> Láser Fianium ( $\lambda_{\text{exc}} = 500\text{nm}$ )

Sería de esperar que se observe una tendencia en la que, a medida que aumenta el tamaño molecular, aumente el tiempo de vida de rotación registrado en MeOH ya que las moléculas se mueven más despacio:  $\theta_{\text{rot}} \mathbf{40} < \mathbf{41} < \mathbf{42}$ . Sin embargo, el compuesto **41** se sale de esta tendencia, lo que podría deberse a un mayor impedimento en la rotación de su BODIPY debido a la congestión estérica provocada por las cadenas al encontrarse el carbono tetrasustituido de la unidad de pentaeritritol mucho más próximo al cromóforo que en el caso de **42**. Así, la tendencia observada es:  $\theta_{\text{rot}} \mathbf{40} < \mathbf{42} < \mathbf{41}$ . En medio acuoso, independientemente del pH, se registraron tiempos de rotación muy superiores para todos los compuestos. Además, el análisis de las curvas de decaimiento por descomposición en biexponenciales permite obtener dos tiempos de rotación diferentes: el más corto se puede interpretar que corresponde a la molécula sin agregar y el de mayor valor al agregado con rotación ralentizada. En todos los casos, el porcentaje del tiempo de rotación de la especie agregada es muy superior al de la especie sin agregar, lo que indica que la mayor parte del compuesto está en forma de agregado en agua pocos minutos después de su disolución.

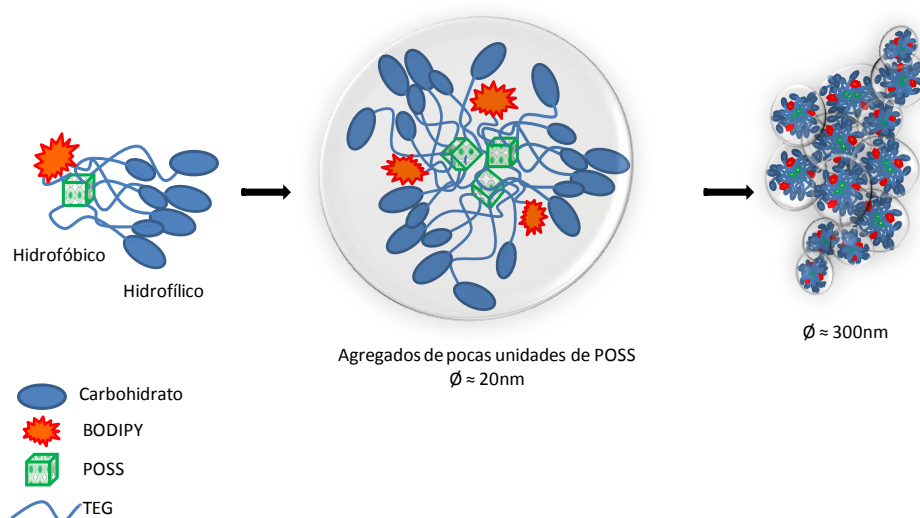
Estos resultados corroboran una vez más que los glico-POSS presentan una gran tendencia a la agregación en medios acuosos y que el autoensamblaje ocurre de manera rápida.

### 6.3 Conclusiones

- 1) Los silsesquioxanos oligoméricos poliédricos (POSS) solubles en agua tienden a formar agregados en medios acuosos debido a la hidrofobia del núcleo de POSS.
- 2) El estudio de la agregación de derivados POSS con distinta longitud de espaciador y valencia en diferentes disolventes empleando un conjunto de técnicas (AF, DLS, GPC, AFM, STEM,  $^1\text{H}$  RMN, AUC y medidas fotofísicas) nos ha permitido establecer el efecto del disolvente y de la estructura del POSS sobre el proceso de agregación.
- 3) La agregación de los glico-POSS no tiene lugar en disolventes orgánicos.
- 4) Los estudios de AF han revelado que el proceso de agregación ocurre de forma rápida ( $< 3$  h) y da lugar a estructuras estables.
- 5) Los glico-POSS dan lugar a agregados de tipo micelar sin retener disolvente en su interior. Las unidades de carbohidrato con grupos hidroxilo libres, de naturaleza polar, se orientan hacia el exterior del agregado en contacto con el agua mientras que los armazones inorgánicos de los POSS (y la sonda fluorescente en el caso de los glico-

POSS con BODIPY) permanece en el interior de la micela. Estos armazones inorgánicos tienden a formar estructuras ordenadas que, sobre la base de modelizaciones teóricas descritas por otros autores<sup>[26]</sup> para sistemas relacionados, deben disponer las caras de los cubos enfrentadas entre sí y desplazadas una con respecto a otra.

- 6) Los estudios de DLS, TEM y AFM demuestran que se forman agregados de unos 20-50 nm que se aglomeran entre sí para dar estructuras mayores de cientos de nanómetros. Los derivados con un espaciador de mayor tamaño dan lugar a estructuras nanométricas de tipo dendrítico.
- 7) De las conclusiones 5 y 6 puede proponerse un modelo de formación de agregados por etapas como el que se muestra en la Figura 6.36.



**Figura 6.36** Modelo en dos etapas de formación de agregados micelares de los glico-POSS en disolución acuosa.

- 8) El número de agregación ( $N_{ag}$ ), estimado a partir de los datos combinados de AUC y DLS, presenta una fuerte dependencia con el porcentaje en masa del núcleo de  $\text{Si}_8\text{O}_{12}$  en la molécula. Así, cuanto menores sean los sustituyentes y mayor el porcentaje de  $\text{Si}_8\text{O}_{12}$  hidrófobo, mayor es el  $N_{ag}$ .
- 9) Aunque la fluorescencia del BODIPY se ve afectada en medios polares, el entorno lipófilo que proporcionan las cadenas del conector entre los carbohidratos y el POSS favorece su emisión. A pesar de que se formen agregados de gran tamaño, no se aprecia agregación del cromóforo. Sus propiedades fotofísicas se ven afectadas por la dispersión de luz de las partículas de agregados que disminuye el rendimiento cuántico y alarga el tiempo de vida de fluorescencia medido.

- 10) El fenómeno de agregación parece no afectar a la complejación de los glico-POSS multivalentes por lectinas específicas para sus unidades de carbohidrato lo que sugiere que la constante de equilibrio de agregación es muy inferior a la de asociación con la lectina, que es capaz de disgregar los agregados rápida y eficazmente para formar una red entrecruzada lectina/glico-POSS muy estable y ordenada con independencia del grado de agregación del glico-POSS (ver Capítulo 4).
- 11) La formación de agregados puede resultar de gran utilidad para el diseño y síntesis de estructuras superiores con definición nanométrica basadas en los nanobloques de construcción de POSS, para la preparación de compuestos multivalentes con una alta densidad de ligandos así como para la encapsulación de genes y fármacos y su liberación controlada en células diana gracias a la interacción específica de los carbohidratos u otros bioepítomos.

## 6.4 Materiales y métodos

Los equipos de resonancia magnética nuclear y de anisotropía de fluorescencia empleados se han descrito previamente en los capítulos 3 y 4, respectivamente.

### 6.4.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El radio hidrodinámico aparente se midió en un equipo DLS (Dynamic Light Scattering) Malvern Zetsizer Nano ZS (red badge ZEN3600) equipado con un láser de 633 nm. (*Malvern Instrumentes*). Para algunas medidas, se empleó también un equipo modelo DynaPro MS/X, Wyatt Inc. Para la detección, se empleó un ángulo de retrosección de 173° (NIBS, “*non invasive back scatter*”); en algunos casos se empleó también el modo de ángulo dual que realiza además medidas en un ángulo de 13°, más sensible a la presencia de agregados. Para las medidas en agua y metanol, se emplearon cubetas desechables de poliestireno DTS0012 (*Sarstedt AG&Co.*). Se realizaron 3 medidas por muestra con un tiempo de equilibrado previo de 100 s.

#### 6.4.2 Técnicas microscópicas

##### 6.4.2.1 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Para el análisis de la topografía de la superficie se empleó un microscopio de fuerza atómica (AFM) de *Veeco/Bruker*, del tipo MultiMode SPM con controlador Nanoscope IVa. Las medidas se realizaron en modo sin contacto “*tapping*”, empleando puntas de frecuencia de resonancia  $f \sim 300$  kHz y constante de elasticidad  $k \sim 40$  N/m, (*Veeco/Bruker*). Se empleó una amplitud de oscilación libre de  $\sim 2.5$  V y  $\sim 2$  V de interacción con la muestra. Las muestras se prepararon sobre soporte de vidrio a una concentración 5  $\mu$ M y se dejaron evaporar al aire.

##### 6.4.2.2 Microscopio Electrónico de Barrido de alta resolución en modo transmisión (STEM)

Las imágenes de los agregados se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido de alta resolución Hitachi: Modelo SU-8000 con filamento de emisión de campo. El microscopio está equipado con 4 detectores que permiten realizar imágenes de electrones transmitidos en campo claro y campo oscuro. Las muestras se prepararon por deposición de una gota (5  $\mu$ L) en una rejilla de cobre recubierto con una película de Fomvar® y estabilizada con carbono de malla 200 y 3 mm de diámetro de *Ted Pella*.

##### 6.4.3 Cromatografía de exclusión de tamaños o permeación en gel (GPC)

El peso molecular relativo se determinó por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) con un cromatógrafo Shimadzu SIL 20A-HT con desgasificador de disolvente DGU-20A3 y bomba isocrática (serie LC-20AD) conectada a un detector diferencial difractométrico (serie RID-10A) y un detector UV-vis SPD-20A Shimadzu. Se acondicionaron las tres columnas (PL-aquagel OH 50, 40 y 30 TM. *Polymer Laboratories*) de 8  $\mu$ m a 37 °C y se utilizó H<sub>2</sub>O milliQ como eluyente a 1 mL/min. El calibrado se realizó con patrones del polisacárido Pullulan® (Pullulan Polysaccharide, PL2090-0100 VARIAN) en un rango de pesos de  $1.8 \times 10^2$  a  $708 \times 10^3$  g/mol.

##### 6.4.4 Ultracentrifugación Analítica (AUC)

Las medidas de AUC se llevaron a cabo a una velocidad de 38 a 48 Krpm en un una ultracentrífuga Optima XL-I equipada con detector de absorción de UV-vis y otro de

interferencia. Los perfiles de SV se registraron a 20 °C en agua milliQ o en tampón de acetato sódico 0.1 M con NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM y MnCl<sub>2</sub> 1mM, a pH 5.25. Las distribuciones de coeficientes de sedimentación fueron calculadas mediante ajuste al modelo de mínimos cuadrados para datos de velocidad de sedimentación usando el método  $c(s)^{[45a]}$  del programa SEDFIT 14.1.

#### **6.4.5 Caracterización Fotofísica**

Las propiedades fotofísicas se registraron en disolución empleando diferentes disolventes de calidad HPLC sin purificación adicional. Las disoluciones fueron preparadas a partir de una disolución madre de partida en MeOH; tras evaporación a vacío del MeOH, se añadieron las cantidades adecuadas del disolvente requerido para una concentración  $\sim 2 \times 10^{-6}$  M.

Los espectros de absorción UV/Vis y fluorescencia se midieron en un espectrofotómetro de doble haz Varian (modelo CARY 4E) y un espectrofluorímetro Edinburgh Instruments (modelo FLSP920), respectivamente. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\phi$ ) se obtuvieron usando como referencia una disolución diluida del BODIPY comercial PM567 en etanol ( $\phi^r = 0.84$ ) o mediante el accesorio de la esfera integradora empleando el compuesto **18** (8ManPropPOSS) como referencia o blanco. Las curvas de desactivación fluorescente se registraron mediante la técnica del contador cuántico de fotones correlacionados en el tiempo (Edinburgh Instruments, modelo FLSP920, con resolución temporal de picosegundos). La emisión se monitorizó en el máximo de fluorescencia, bajo excitación a 500 nm mediante el láser supercontinuo Fianium. Los tiempos de vida ( $\tau$ ) se obtuvieron a partir de un ajuste exponencial de la curva de decaimiento, previamente deconvolucionada para eliminar la señal láser, y a partir de la pendiente de cada recta. La bondad del ajuste se determinó en base al parámetro estadístico chi-cuadrado ( $\chi^2 < 1.3$ ) y la distribución simétrica del análisis de los residuos. Las constantes de velocidad de desactivación radiante ( $k_r$ ) y no-radiante ( $k_{nr}$ ) se calcularon a partir del rendimiento cuántico de fluorescencia y el tiempo de vida según las expresiones:  $k_r = \phi/\tau$  y  $k_{nr} = (1 - \phi)/\tau$ .

#### **Anisotropía de fluorescencia**

La anisotropía de fluorescencia resuelta en el tiempo ( $\theta_{rot}$ ) se registró en el espectrofluorímetro Edinburgh Instruments (modelo FLSP920) en configuración de ángulo



recto (L-format) y con luz linealmente polarizada registrada en orientación vertical ( $V = 0^\circ$ ) y horizontal ( $H = 90^\circ$ ). A partir de los espectros de fluorescencia, se obtuvieron los valores de anisotropía  $r$  mediante la ecuación  $r = (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) / (I_{VV} + 2G \cdot I_{VH})$ , siendo  $G = I_{HV} / I_{HH}$  el factor isotrópico de corrección. Las curvas de decaimiento fluorescente fueron registradas monitorizando la emisión en el máximo de fluorescencia y bajo excitación a 500 nm mediante el láser supercontinuo Fianium, manteniendo constante el tiempo de integración de 40 segundos y 4 repeticiones. El valor del tiempo de rotación ( $\theta_{\text{rot}}$ ) fue determinado a partir de la ecuación  $r(t) = r_0 e^{-t/\theta}$ , donde  $r = (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) / (I_{VV} + 2G \cdot I_{VH})$  y  $G = I_{HV} / I_{HH}$ .

### Referencias

- [1] G. M. Whitesides and B. Grzybowski, *Science (Washington, DC, U. S.)* **2002**, 295, 2418-2421.
- [2] a) L. Zheng, S. Hong, G. Cardoen, E. Burgaz, S. P. Gido and E. B. Coughlin, *Macromolecules* **2004**, 37, 8606-8611; b) L. Zheng, A. J. Waddon, R. J. Farris and E. B. Coughlin, *Macromolecules* **2002**, 35, 2375-2379; c) Y.-C. Yen, S.-W. Kuo, C.-F. Huang, J.-K. Chen and F.-C. Chang, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 10821-10829; d) C. Y. Jung, H. S. Kim, H. J. Hah and S. M. Koo, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2009**, 1219-1221; e) J. Miao and L. Zhu, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 1879-1887; f) Y. El Aziz, A. R. Bassindale, P. G. Taylor, R. A. Stephenson, M. B. Hursthouse, R. W. Harrington and W. Clegg, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2013**, 46, 988-1001; g) E. L. Heeley, D. J. Hughes, Y. El Aziz, P. G. Taylor and A. R. Bassindale, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2013**, 46, 4944-4954.
- [3] a) G. Evmenenko, S. L. Cockroft and P. Dutta, *Langmuir* **2013**, 30, 196-202; b) J. Hwan Jung, J. C. Furgal, T. Goodson, T. Mizumo, M. Schwartz, K. Chou, J.-F. Vonnet and R. M. Laine, *Chem. Mater.* **2012**, 24, 1883-1895.
- [4] a) S. Fabritz, S. Hoerner, O. Avrutina and H. Kolmar, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, 11, 2224-2236; b) H. Ghanbari, B. G. Cousins and A. M. Seifalian, *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, 32, 1032-1046.
- [5] a) J. Miyake and Y. Chujo, *Macromol. Rapid Commun.* **2008**, 29, 86-92; b) J. Lee, H.-J. Cho, B.-J. Jung, N. S. Cho and H.-K. Shim, *Macromolecules* **2004**, 37, 8523-8529; c) K.-Y. Pu, K. Li and B. Liu, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2010**, 22, 643-646.
- [6] a) M. A. Castriciano, N. Leone, P. Cardiano, S. Manickam, L. M. Scolaro and S. Lo Schiavo, *J. Mater. Chem. C* **2013**, 1, 4746-4753; b) O. J. Dautel, G. Wantz, R. Almairac, D. Flot, L. Hirsch, J.-P. Lere-Porte, J.-P. Parneix, F. Serein-Spirau, L. Vignau and J. J. E. Moreau, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4892-4901.
- [7] Y.-C. Lin and S.-W. Kuo, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2011**, 49, 2127-2137.
- [8] a) Y. Xiao, K. Y. Mya, B. H. Tan and C. B. He, *Polym. Bull. (Heidelberg, Ger.)* **2012**, 68, 2131-2144; b) C. McCusker, J. B. Carroll and V. M. Rotello, *Chemical Communications* **2005**, 996-998.
- [9] J. Liu, K. Li, J. Geng, L. Zhou, P. Chandrasekharan, C.-T. Yang and B. Liu, *Polym. Chem.* **2013**, 4, 1517-1524.
- [10] W. Zhang and A. H. E. Muller, *Prog. Polym. Sci.* **2013**, 38, 1121-1162.

- [11] a) S. Hoerner, S. Fabritz, H. D. Herce, O. Avrutina, C. Dietz, R. W. Stark, M. C. Cardoso and H. Kolmar, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 2258-2265; b) Y. Pu, S. Chang, H. Yuan, G. Wang, B. He and Z. Gu, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3658-3666; c) L. Lu, C. Zhang, L. Li and C. Zhou, *Carbohydrate Polymers* **2013**, *94*, 444-448.
- [12] a) J. Deng, J. T. Polidan, J. R. Hottle, C. E. Farmer-Creely, B. D. Viers and A. R. Esker, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15194-15195; b) P. T. Mather, B.-S. Kim, Q. Ge and C. Liu in *Synthesis of nonionic telechelic polymers incorporating polyhedral oligosilsesquioxane and uses thereof*, Vol. University of Connecticut, USA . **2004**, p. 20 pp; c) M. P. Kapoor, N. Setoyama, Q. Yang, M. Ohashi and S. Inagaki, *Langmuir* **2005**, *21*, 443-449; d) T. Hayakawa, M.-a. Kakimoto and H. Yokoyama, **2006**, pp. COLL-484; e) W. Lee, S. Ni, J. Deng, B.-S. Kim, S. K. Satija, P. T. Mather and A. R. Esker, *Macromolecules* **2007**, *40*, 682-688; f) Y. Liu, W. Yin, R. D. Gandour and A. R. Esker, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **2009**, *50*, 864-865; g) X. Yu, S. Zhong, X. Li, Y. Tu, S. Yang, R. M. Van Horn, C. Ni, D. J. Pochan, R. P. Quirk, C. Wesdemiotis, W.-B. Zhang and S. Z. D. Cheng, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16741-16744; h) S. Z. Cheng, W. Zhang, X. Yu, I. F. Hsieh, Y. Li, K. Yue, X. Done and H.-J. Sun, *243rd ACS National Meeting & Exposition*, (San Diego, CA, United States,) **2012**, pp. PMSE-51; i) K. Yue, C. Liu, K. Guo, X. Yu, M. Huang, Y. Li, C. Wesdemiotis, S. Z. D. Cheng and W.-B. Zhang, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2012**, *45*, 8126-8134; j) K. Yue, W.-B. Zhang, C. Liu and S. Z. D. Cheng, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **2012**, *53*, 238; k) J. He, K. Yue, Y. Liu, X. Yu, P. Ni, K. A. Cavicchi, R. P. Quirk, E.-Q. Chen, S. Z. D. Cheng and W.-B. Zhang, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 2112-2120; l) L. Chen, B. Zeng, J. Xie, S. Yu, C. Yuan, Y. Pan, W. Luo, X. Liu, K. He, Y. Xu and L. Dai, *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 1022-1029; m) S. Z. D. Cheng, *245th ACS National Meeting & Exposition* (New Orleans, LA, United States) **2013**, pp. POLY-241; n) Z. Wang, Y. Li, X.-H. Dong, X. Yu, K. Guo, H. Su, K. Yue, C. Wesdemiotis, S. Z. D. Cheng and W.-B. Zhang, *Chemical Science* **2013**, *4*, 1345-1352; o) F. Lahooti-Fard, M. Imani and A. A. Yousefi, *J. Iran. Chem. Soc.* **2013**, *10*, 229-236; p) Y. Li, Z. Wang, J. Zheng, H. Su, F. Lin, K. Guo, X. Feng, C. Wesdemiotis, M. L. Becker, S. Z. D. Cheng and W.-B. Zhang, *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 1026-1032; q) H. Su, J. Zheng, Z. Wang, F. Lin, X. Feng, X.-H. Dong, M. L. Becker, S. Z. D. Cheng, W.-B. Zhang and Y. Li, *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 645-650.
- [13] W.-B. Zhang, X. Yu, C.-L. Wang, H.-J. Sun, I. F. Hsieh, Y. Li, X.-H. Dong, K. Yue, R. Van Horn and S. Z. D. Cheng, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2014**, Ahead of Print.
- [14] a) F. Minami, S.-i. Yamamoto, Y. Miyasaka and O. Moriya, *Polymer* **2011**, *52*, 4744-4752; b) F. Du, J. Tian, H. Wang, B. Liu, B. Jin and R. Bai, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2012**, *45*, 3086-3093; c) F. Du, Y. Bao, B. Liu, J. Tian, Q. Li and R. Bai, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2013**, *49*, 4631-4633; d) S.-W. Kuo, J.-L. Hong, Y.-C. Huang, J.-K. Chen, S.-K. Fan, F.-H. Ko, C.-W. Chu and F.-C. Chang, *J. Nanomater.* **2012**, 749732, 749710 pp; e) W. Yuan, T. Shen, X. Liu and J. Ren, *Mater. Lett.* **2013**, *111*, 9-12; f) W. Zhang, S. Wang, X. Li, J. Yuan and S. Wang, *Eur. Polym. J.* **2012**, *48*, 720-729; g) Z. Wang, B. H. Tan, H. Hussain and C. He, *Colloid Polym. Sci.* **2013**, *291*, 1803-1815; h) L. Lu, C. Zhang, L. Li and C. Zhou, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94*, 444-448.
- [15] D. A. Tomalia, *New J. Chem.* **2012**, *36*, 264-281.
- [16] M. P. Stevens, *Polymer chemistry* Oxford, **1990**, p. 99.
- [17] a) H. Hussain, B. H. Tan, G. L. Seah, Y. Liu, C. B. He and T. P. Davis, *Langmuir* **2010**, *26*, 11763-11773; b) Y. Zheng, L. Wang, R. Yu and S. Zheng, *Macromol. Chem. Phys.* **2012**, *213*, 458-469; c) K. Y. Mya, E. M. J. Lin, C. S. Gudipati, L. Shen and C. He, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9119-9127; d) J. Pyun, K. Matyjaszewski, J. Wu, G.-M. Kim, S. B. Chun and P. T. Mather, *Polymer* **2003**, *44*, 2739-2750.

- [18] a) K. Y. Mya, X. Li, L. Chen, X. Ni, J. Li and C. He, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 9455-9462; b) W. Yuan, X. Liu, H. Zou and J. Ren, *Polymer* **2013**, *54*, 5374-5381; c) W. Yuan, X. Liu, H. Zou, J. Li, H. Yuan and J. Ren, *Macromol. Chem. Phys.* **2013**, *214*, 1580-1589.
- [19] a) S.-W. Kuo, H.-F. Lee, W.-J. Huang, K.-U. Jeong and F.-C. Chang, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2009**, *42*, 1619-1626; b) W. Zhang, B. Fang, A. Walther and A. H. E. Mueller, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2009**, *42*, 2563-2569; c) W. Zhang, L. Liu, X. Zhuang, X. Li, J. Bai and Y. Chen, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 7049-7061; d) W. Zhang, X. Zhuang, X. Li, Y. Lin, J. Bai and Y. Chen, *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 124-129; e) L. Ma, H.-P. Geng, J.-X. Song, J.-Z. Li, G.-X. Chen and Q.-F. Li, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 10586-10591; f) Z. Wang, Y. Li, X.-H. Dong, X. Yu, K. Guo, H. Su, K. Yue, C. Wesdemiotis, S. Z. D. Cheng and W.-B. Zhang, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1345-1352.
- [20] a) W. Zhang, J. Yuan, S. Weiss, X. Ye, C. Li and A. H. E. Mueller, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2011**, *44*, 6891-6898; b) L. Wang, K. Zeng and S. Zheng, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 898-909.
- [21] W. Zhang and A. H. E. Mueller, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2010**, *43*, 3148-3152.
- [22] a) R.-S. Shih, C.-H. Lu, S.-W. Kuo and F.-C. Chang, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 12855-12862; b) T. T. Toth-Fejel, *IEEE Sens. J.* **2008**, *8*, 1036-1040; c) Y.-C. Wu and S.-W. Kuo, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 2982-2991; d) Y.-R. Wu, Y.-C. Wu and S.-W. Kuo, *Macromol. Chem. Phys.* **2013**, *214*, 1496-1503; e) W.-H. Hu, K.-W. Huang, C.-W. Chiou and S.-W. Kuo, *Macromolecules (Washington, DC, U. S.)* **2012**, *45*, 9020-9028.
- [23] B. Jiang, W. Tao, X. Lu, Y. Liu, H. Jin, Y. Pang, X. Sun, D. Yan and Y. Zhou, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 767-772.
- [24] S.-y. Kuwahara, K. Yamamoto and J.-i. Kadokawa, *Chemistry Letters* **2010**, *39*, 1045-1047.
- [25] a) K. Beppu, Y. Kaneko, J.-i. Kadokawa, H. Mori and T. Nishikawa, *Polym. J. (Tokyo, Jpn.)* **2007**, *39*, 1065-1070; b) N. Iwakiri, T. Nishikawa, Y. Kaneko and J.-I. Kadokawa, *Colloid Polym. Sci.* **2009**, *287*, 577-582; c) T. Nishikawa, N. Iwakiri, Y. Kaneko, A. Taguchi, K. Fukushima, H. Mori, N. Morone and J.-i. Kadokawa, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2074-2085.
- [26] E. R. Chan, X. Zhang, C.-Y. Lee, M. Neurock and S. C. Glotzer, *Macromolecules* **2005**, *38*, 6168-6180.
- [27] E. Salomonsson in *Reading a Glycocode. Mechanism and function of galectin-glycan interactions*, Vol. Lund University, Lund, **2011**.
- [28] a) O. Rusin, V. Kral, J. O. Escobedo and R. M. Strongin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1373-1376; b) K.-R. Wang, H.-W. An, R.-X. Rong, Z.-R. Cao and X.-L. Li, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *58*, 27-32.
- [29] N. K. Maluf and T.-C. Yang, *Biophys. Chem.* **2011**, *154*, 82-89.
- [30] a) B. Trastoy, D. A. Bonsor, M. Eugenia Perez-Ojeda, M. Luisa Jimeno, A. Mendez-Ardoy, J. M. Garcia Fernandez, E. J. Sundberg and J. L. Chiara, *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 3191-3201; b) J. Henig, E. Toth, J. Engelmann, S. Gottschalk and H. A. Mayer, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 6124-6138.
- [31] Imagen modificada de Malvern Instruments Ltd. 2003-2004. Zetasizer Nanoseries User Manual. United Kingdom
- [32] Imagen modificada de Malvern Instruments Ltd. 2003-2004. Zetasizer Nanoseries User Manual. United Kingdom

- [33] Los diámetros moleculares se calcularon a partir de modelos teóricos de los glico-POSS en conformaciones extendidas utilizando el método semiempírico AM1 con optimización completa de la geometría molecular.
- [34] Para simplificar las gráficas, de las tres medidas realizadas a cada tiempo, se ha representado sólo la tercera de ellas.
- [35] F. Lopez Arbeloa, J. Banuelos, V. Martinez, T. Arbeloa and I. Lopez Arbeloa, *Int. Rev. Phys. Chem.* **2005**, 24, 339-374.
- [36] L. Benjamin and G. C. Benson, *J. Phys. Chem.* **1963**, 67, 858-861.
- [37] S. Scheiner and M. Cuma, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1511-1521.
- [38] Por análisis mediante <sup>1</sup>H-RMN se observa un porcentaje residual de agua ocluida en la molécula después de haber sido liofilizada dos veces.
- [39] M. J. L. Castro, J. Kovensky and A. F. Cirelli, *Journal of Carbohydrate Chemistry* **2000**, 19, 1175-1184.
- [40] a) S. N. Magonov and N. A. Yerina, **2005**, pp. 113-155; b) G. Binnig, C. F. Quate and C. Gerber, *Physical Review Letters* **1986**, 56, 930-933.
- [41] Imagen tomada de H. Greenwood Hansma.  
Departamento de Física, Universidad de California en Santa Barbara.  
<http://web.physics.ucsb.edu/~hhansma/biomolecules.htm>
- [42] O. Hayashida, K. Mizuki, K. Akagi, A. Matsuo, T. Kanamori, T. Nakai, S. Sando and Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 594-601.
- [43] B. Monterroso, C. Alfonso, S. Zorrilla and G. Rivas, *Methods (Amsterdam, Neth.)* **2013**, 59, 349-362.
- [44] J. M. G. Izquierdo in *ENSAMBLAJE DE FtsZ DE E. coli, PROTEÍNA ESENCIAL EN LA DIVISIÓN BACTERIANA: EFECTO DE LA AGLOMERACIÓN MACROMOLECULAR*, Vol. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, **2004**.
- [45] a) P. Schuck, *Biophys. J.* **2000**, 78, 1606-1619; b) P. Schuck and P. Rossmanith, *Biopolymers* **2000**, 54, 328-341.
- [46] K. E. Van Holde, *Physical Biochemistry. 2nd Ed*, Prentice-Hall, **1985**, p. 287 pp.
- [47] M. Eugenia Perez-Ojeda, B. Trastoy, I. Lopez-Arbeloa, J. Banuelos, A. Costela, I. Garcia-Moreno and J. Luis Chiara, *Chemistry-a European Journal* **2011**, 17, 13258-13268.
- [48] Tras excitar la molécula transcurre un tiempo en el que la molécula sigue rotando hasta que adopta la disposición “adecuada” o se relaja para registrar su desactivación en el detector. Dicho tiempo se traduce en un crecimiento al principio de la curva de decaimiento del tiempo de vida.
- [49] S. F. Lee, Q. Verolet and A. Fuerstenberg, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 8948-8951.
- [50] H. Liu, Y. Wang, C. Liu, H. Li, B. Gao, L. Zhang, F. Bo, Q. Bai and X. Ba, *J. Mater. Chem.* **2012**, 22, 6176-6181.
- [51] Al realizar la medida del tiempo de vida se registra una curva que engloba el tiempo de vida, y toda la respuesta instrumental (láser, óptica y electrónica del instrumento). Por eso, para desconvolucionar las curvas necesitamos medir el IRF empleando un patrón de dispersión (ludox o POSS) que nos permita sustraerla respuesta instrumental y obtener la curva del tiempo de vida.
- [52] Aunque en MeOH no se da el proceso de agregación, estudios previos de nuestro grupo demostraron que la partícula de POSS disgregada en el medio (1-6 nm) induce dispersión óptica aunque ésta es mucho menor que la debida a la presencia de agregados.
- [53] A. Costela, I. Garcia-Moreno, L. Cerdan, V. Martin, O. Garcia and R. Sastre, *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2009**, 21, 4163-4166.

## *Conclusiones generales*

### **Conclusiones generales**

- 1) Se han desarrollado nuevos colorantes BODIPY con emisión fluorescente y láser en las zonas de mayor interés del espectro electromagnético: azul y roja. Los nuevos derivados BODIPY presentan buenas propiedades ópticas, elevada eficiencia láser y buenas fotoestabilidades, tanto en fase líquida como en estado sólido, mejorando significativamente el comportamiento de los colorantes láser actualmente comercializados. La naturaleza, número y posición de los sustituyentes en el esqueleto de BODIPY permiten modular de forma controlada las propiedades ópticas de los mismos en todo el espectro visible.
- 2) Se ha desarrollado una metodología eficaz para la síntesis de colorantes híbridos por unión covalente al núcleo de silsesquioxano POSS-T<sub>8</sub>. El número de cromóforos unidos covalentemente a un núcleo de POSS afecta sensiblemente a sus propiedades fotofísicas ya que la geometría de la molécula y la flexibilidad conformacional del grupo conector empleado favorecen la formación de agregados tipo-H entre los BODIPYs. El colorante híbrido BODIPY-POSS presentó mejor eficiencia láser que su BODIPY precursor y que el colorante comercial PM567 pero, sobre todo, demostró una elevada fotoestabilidad incluso bajo condiciones muy drásticas de bombeo.
- 3) El octaquis(3-azidopropil)octasilsesquioxano **6** es un material de partida ideal para el ensamblaje controlado de POSS hetero-bifuncionales de estructura bien definida a escala molecular mediante reacción CuAAC acelerada por ligando. La selección rigurosa de la estequiometría de la reacción así como de ligandos dadores adecuados en el catalizador de cobre resultó ser esencial para la mono-funcionalización selectiva de las moléculas de POSS homo-octafuncionales de simetría cúbica. La introducción sucesiva de dos grupos diferentes con reactividad ortogonal entre sí en el núcleo de POSS se ha logrado de manera eficiente a través de dos funcionalizaciones secuenciales mediante reacción CuAAC acelerada por ligando. Los nuevos POSS hetero-bifuncionales se pueden utilizar como nanobloques de construcción para el ensamblaje controlado de nanomateriales híbridos, así como también para la síntesis de POSS monofuncionalizados con una sonda fluorescente y con 7 posiciones reactivas adicionales que permiten la introducción de sendos epítomos bioreconocibles para su uso en biología celular, fotónica y bioimagen.

- 4) La estrategia desarrollada para la bifuncionalización controlada de POSS ha sido empleada con éxito para la síntesis de glicodendrimeros de geometría pseudo-esférica con núcleo de POSS marcados fluorescentemente.
- 5) Los glicodendrimeros sintetizados muestran una alta afinidad por lectinas que reconocen específicamente sus epítopos sacarídicos gracias a un efecto multivalente muy efectivo. La presencia del grupo fluorescente permite el estudio de esta interacción mediante anisotropía de fluorescencia. Sobre la base de los resultados obtenidos por SPR, el incremento de valencia de los glico-POSS de 8 a 24 epítopos de  $\alpha$ -D-manosa (o de 7 a 21 en el caso de los compuestos marcados fluorescentemente) supone una mejora de la afinidad por Con A en más de un orden de magnitud. Los resultados de AF demuestran igualmente, a nivel cualitativo, una afinidad mucho mayor para los dendrimeros con 21 epítopos que para los glico-POSS con solo 7 y sugieren una estequiometría Con A/glico-POSS  $\geq 12$  para los compuestos con 21 unidades sacarídicas.
- 6) Se ha desarrollado una estrategia general de protección de los grupos hidroxilo de los carbohidratos para la síntesis de glico-POSS, basada en la introducción de grupos trietilsililo con un protocolo sencillo y con alto rendimiento que además permite la desprotección final eficiente de los grupos hidroxilo sin afectar a la estructura de silsesquioxano. Esta nueva estrategia se ha aplicado con éxito a la síntesis de nuevos glico-POSS funcionalizados con  $\beta$ -D-galactosa y con el disacárido lactosa y sus correspondientes análogos marcados fluorescentemente con una unidad de BODIPY. El estudio por anisotropía de fluorescencia de interacción de estos glico-POSS con lectinas de origen humano, que reconocen específicamente  $\beta$ -D-galactopiranosas (Gal-1C3S, Gal-3 y Gal-8S), ha demostrado que, frente a los sistemas monovalentes, éstos poseen una mayor afinidad por estas galectinas gracias al efecto multivalente. Estos resultados tienen un alto interés biomédico dadas las implicaciones de estas proteínas en procesos de regulación del sistema inmune y del cáncer.
- 7) Los silsesquioxanos oligoméricos poliédricos (POSS) solubles en agua tienden a formar agregados en medios acuosos debido a la hidrofobia de su armazón inorgánico. El estudio de la agregación de derivados POSS con distinta longitud de espaciador y valencia en diferentes disolventes empleando un conjunto de técnicas (AF, DLS, GPC, AFM, STEM,  $^1\text{H}$  RMN, AUC y medidas fotofísicas) nos ha permitido establecer el efecto del

disolvente y de la estructura del POSS sobre el proceso de agregación. Los agregados a los que dan lugar son de tipo micelar presentando las unidades de carbohidrato con grupos hidroxilo libres, de naturaleza polar, hacia el exterior del agregado en contacto con el agua mientras que los armazones inorgánicos de los POSS (y la sonda fluorescente en el caso de los glico-POSS marcados) permanece en el interior de la micela. Se forman micelas de unos 20-50 nm que se aglomeran entre sí para dar estructuras mayores, de unos cientos de nanómetros.

- 8) El número de agregación ( $N_{ag}$ ), estimado a partir de los datos combinados de AUC y DLS, presenta una fuerte dependencia con el porcentaje en masa del núcleo de  $Si_8O_{12}$  en la molécula. Así, cuanto más pequeños sean los sustituyentes y mayor el porcentaje en masa de  $Si_8O_{12}$  hidrófobo, mayor es el  $N_{ag}$ .
- 9) El fenómeno de agregación no afecta a la actividad biológica de los glico-POSS multivalentes que, en presencia de la proteína, muestran mayor tendencia hacia la complejación de la lectina que hacia la formación de agregados. La formación de agregados puede resultar de gran utilidad para el diseño y síntesis de estructuras superiores con definición nanométrica basadas en los nanobloques de construcción de POSS así como para la encapsulación de genes y fármacos y su liberación controlada en células diana gracias a la interacción específica de los carbohidratos u otros bioepítomos.



